

L'ANTIBIOGRAMME EN BACTERIOLOGIE VÉTÉRINAIRE

TESTS CLASSIQUES ET "DADE-STAT TRAY"

THESE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 14 Mai 1965

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Alain POURCELOT

Né le 30 Octobre 1941 à PARIS



IMPRIMERIE DELZANNO s. a.

32, Cours d'Herbouville, 32
LYON

1965

**L'ANTIBIOGRAMME
EN BACTERIOLOGIE VETERINAIRE**

TESTS CLASSIQUES
ET "DADE-STAT TRAY"

L'ANTIBIOGRAMME EN BACTERIOLOGIE VÉTÉRINAIRE

TESTS CLASSIQUES ET "DADE-STAT TRAY"

THESE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
et soutenue publiquement le 14 Mai 1965

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Alain POURCELOT

Né le 30 Octobre 1941 à PARIS



IMPRIMERIE DELZANNO s. a.

32, Cours d'Herbouville, 32
LYON

1965

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Directeur	MM. FLORIO
Directeur honoraire	JUNG TAPERNOUX
Professeur honoraire	CUNY

PROFESSEURS

Pharmacie et Toxicologie	MM. TAPERNOUX
Anatomie descriptive, Extérieur, Anatomie appliquée	BARONE
Physiologie, Thérapeutique, Pharmacodynamie ..	BOST
Histologie, Embryologie, Anatomie pathologique ..	LUCAM
Hygiène et Industrie des aliments d'origine animale	FLACHAT
Zoologie appliquée, Parasitologie externe, Parasitologie interne	EUZEBY
Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores, Législation vétérinaire	FLORIO
Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour	COTTEREAU
Technique chirurgicale, Pathologie chirurgicale ..	COLLET
Obstétrique, Pathologie de la reproduction	BERTRAND
Ethnologie, Hygiène, Zootechnie, Economie rurale	FROGET
Botanique appliquée, Agronomie, Alimentation ..	JEAN-BLAIN
Physique et Chimie biologiques et médicales	MAGAT
Maladies contagieuses, Zoonoses, Législation sanitaire	JOUBERT

MAITRES DE CONFERENCES

MM. FERNEY, RUCKEBUSCH, BUSSIERAS.

CHEFS DE TRAVAUX

M. OUDAR, Agrégé.

MM. CHANTEGRELET, DESCHANEL, JEAN-BLAIN Claude, LAPRAS,
LE NIHOUANEN, PROY, VAN HAVERBEKE, VERINE.

ASSISTANTS

Mlles DUFOUR, GENTILETTI, GONZALES.

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : M. le Professeur MONNET, de la Faculté de Médecine.
Premier Assesseur : M. le Professeur JOUBERT, de l'Ecole Vétérinaire.
Deuxième Assesseur : M. le Professeur FROGET, de l'Ecole Vétérinaire.

La Faculté de Médecine et l'Ecole Nationale Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation, ni improbation.

A MES PARENTS

Que ce travail soit le témoignage de ma piété filiale et de ma reconnaissance pour la grande affection dont ils m'ont toujours entouré.

A MON FRERE : GUY POURCELOT

Docteur ès-Sciences

Maître Assistant à la Faculté des Sciences de Paris

Son exemple m'a beaucoup aidé. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon affection.

A MA BELLE-SŒUR

A TOUS LES MIENS

Avec toute mon affection.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552628_0064

AU DOCTEUR-VÉTÉRINAIRE PIERRE LOUVOT

Conseiller Général de la Haute-Saône

Sa noble figure, son humanisme
distingué ont été déterminants pour ma
précoce vocation.

Hommage respectueux.

A NOTRE PRESIDENT DU JURY

MONSIEUR LE PROFESSEUR MONNET

de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

Il nous a fait un grand honneur en acceptant de présider le jury de notre thèse. Nous le prions de trouver ici l'expression de notre profond respect.

A NOTRE JURY DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. JOUBERT

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Qui nous a inspiré ce travail et auquel nous exprimons toute la reconnaissance que nous lui devons pour son enseignement remarquable et pour la bienveillance qu'il nous a toujours témoignée.

Hommage respectueux.

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. FROGET

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Avec nos remerciements sincères pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'être l'un de nos juges.

Infinie reconnaissance pour la confiance qu'il veut bien nous accorder.

Hommage respectueux.

AVANT-PROPOS

Il nous est agréable de remercier ici M. Y.-A. CHABBERT, de l'Institut Pasteur de Paris, qui, dès novembre 1963, a orienté notre travail par ses conseils judicieux et qui nous a beaucoup appris lorsqu'il nous a reçu.

Nous remercions également M. G. TROUYEZ, de l'Institut Mérieux, qui nous a inspiré la troisième partie de ce travail et nous a communiqué avec beaucoup d'amabilité ses nombreuses et pertinentes observations.

Nous associons également M. l'Agrégé OUDAR, qui nous a accueilli dans le Laboratoire de Bactériologie de l'Ecole Vétérinaire de Lyon, ainsi que M^{me} F. BARDY et M^{lle} M.-Th. CORDIER, qui nous ont inculqué avec bienveillance les premiers principes de Bactériologie et nous ont aidé dans notre expérimentation.

Qu'il nous soit également permis d'associer à cet hommage tous nos maîtres de l'Ecole Vétérinaire envers lesquels nous sommes si redevables et qu'en particulier M. le Directeur FLORIO et M. le Professeur JOUBERT veuillent bien trouver ici l'expression de notre gratitude pour l'accueil bienveillant qu'ils ont réservé à notre désir de faire une année d'étude spéciale dans le cadre du Laboratoire de Bactériologie.

INTRODUCTION

L'art de l'investigation scientifique est la pierre angulaire de toutes les sciences expérimentales. Si les faits qui servent de base au raisonnement sont mal établis ou erronés, tout s'écroulera ou tout deviendra faux.

Claude BERNARD.

Une courte période d'une vingtaine d'années (1878-1895) a suffi à la découverte des germes figurés responsables de la plupart des maladies infectieuses et, de même, à peine vingt ans (1935-1955) ont été nécessaires pour que soit dressé un palmarès tout aussi brillant dans le domaine des antibiotiques.

Mais, tandis que les découvertes de l'époque pasteurienne aboutissaient généralement à reconnaître une forme et à donner un nom aux agents responsables des maladies, la découverte des antibiotiques met en jeu l'existence même des agents pathogènes et leurs manifestations morbides.

L'antibiothérapie, en effet, a révolutionné la Médecine en modifiant des pronostics jusque-là défavorables et en permettant des cures rapides de moins en moins onéreuses au fur et à mesure que l'usage des antibiotiques se répand. Elle a, par ailleurs, favorisé l'essor de la chirurgie grâce à la sécurité que confère son emploi à titre préventif. Cette

place immense que tiennent les antibiotiques dans la thérapeutique justifie bien l'enthousiasme qu'ils suscitèrent chez ceux qui les ont vu apparaître.

Cependant, depuis quelques années, certains auteurs alertent l'opinion et affirment que cette arme merveilleuse, mal utilisée, perd de son efficacité et devient même dangereuse. Il est fait allusion à la résistance bactérienne, à la substitution de flore, aux accidents allergiques... Le problème a été évoqué avec une acuité toute particulière par les médecins, mais le monde vétérinaire s'est également ému et le Professeur L. JOUBERT (9, 48) parlait récemment de « l'utilisation inconsidérée des antibiotiques, arme thérapeutique souveraine, que la mode a banalisés et destitués d'une grande part de leur efficacité. Ces drogues-miracles des années 1945-1950 servent aujourd'hui souvent à dissimuler la maladie et à brouiller le dépistage » ; et il en conclut que des mesures sont à opposer d'urgence à une pratique dont le « double tranchant laisse présager de véritables catastrophes sanitaires ».

Une de ces mesures, et certainement la plus importante, est la nécessité pour le praticien de s'appuyer, lors de la mise en œuvre d'une antibiothérapie, sur des résultats précis fournis par le laboratoire clinique. Certains peuvent regretter l'époque où soigner un organisme malade était un véritable art, où l'intuition du médecin jouait un rôle capital, mais actuellement, selon les propres termes de R. MARTIN (14), « le traitement des infections bactériennes n'est plus un art, il s'appuie sur des examens ayant une précision et une rigueur scientifiques ».

Ce rôle de pilote, le laboratoire clinique le jouera tout particulièrement grâce à la réalisation de tests de sensibilité des agents pathogènes aux différents antibiotiques — ainsi les antibiotiques seront utilisés rationnellement.

Les résultats obtenus constitueront la fiche signalétique du germe en cause, devant être nécessairement établie avant tout traitement.

Rappelons enfin que la Médecine vétérinaire est confrontée avec des impératifs d'ordre économique absolument essentiels qui impliquent qu'un bon traitement ne peut être que bref et peu onéreux. C'est pourquoi les vétérinaires sont particulièrement intéressés par des tests demandant des délais moindres et de réalisation facile.

Dans ce travail, nous avons essayé de dégager les principes qui président à la réalisation d'un antibiogramme et à montrer la complexité des phénomènes qui se cachent derrière une apparente simplicité de principe et de réalisation.

Puis, après avoir décrit les principales techniques classiques concernant l'antibiogramme en Médecine vétérinaire, nous nous sommes penché sur la valeur d'une nouvelle technique accélérée.

PREMIÈRE PARTIE

ETUDE GENERALE ET THEORIQUE DE L'ANTIBIOGRAMME

GENERALITES

DEFINITIONS

Dès l'obtention des antibiotiques, on s'aperçut que ces médicaments possédaient une remarquable spécificité d'action. On peut considérer que chaque antibiotique possède un « spectre d'activité » qui correspond aux diverses espèces microbiennes sensibles à son action. Cette notion de spectre d'activité s'attache à un antibiotique vis-à-vis des populations bactériennes ; si l'action antibactérienne est envisagée pour un germe déterminé en fonction de la gamme des antibiotiques, on pourra définir le « spectre de sensibilité » de ce germe, son « antibiogramme », c'est-à-dire l'ensemble des agents chimiothérapiques qui sont actifs sur lui. En fait, par une extension du langage, l'antibiogramme représente actuellement aussi bien la technique de mise en évidence du spectre de sensibilité que le spectre de sensibilité lui-même. On parle également de « test de sensibilité » des bactéries aux agents chimiothérapiques.

L'antibiogramme n'est pas établi une fois pour toute pour chaque espèce bactérienne. En effet, une espèce bactérienne n'est pas homogène, elle est constituée par une mosaïque de races et de souches qui présentent des degrés de sensibilité variables vis-à-vis de tel ou tel antibiotique. Ainsi WELSCH (97), en 1950, a montré que, pour 976 souches de staphylocoque, la concentration minimale de Pénicilline susceptible d'arrêter le développement bactérien, variait dans le rapport de 1 à 500.000 selon les souches. En génétique bactérienne, le degré de sensibilité à un antibiotique est un caractère clonal génotypique propre à chaque individu. A l'échelle de l'individu même, la sensibilité peut évoluer dans le temps pour différentes raisons (mutation, sélection, etc...). La notion de temps à l'échelle des infiniment petits apparaît singulièrement amoindrie puisqu'une génération de bactéries ne représente que quelques minutes. Le spectre de sensibilité d'un germe est une réalité extrêmement instable ; c'est pourquoi le choix de l'antibiotique pour une thérapeutique constitue un problème sans cesse renouvelé.

HISTORIQUE

Les techniques de titrage de l'antibiosensibilité sont actuellement très nombreuses, mais peuvent être classées en deux groupes :

- la méthode de diffusion ;
- la méthode des dilutions.

C'est à HEATLEY (1914-1944) (43) que revient le mérite d'avoir appliqué le principe de la diffusion en gélose au dosage de la Pénicilline, mais c'est GARROD (50) qui, le premier, utilisa la technique des cupules en gélose pour déterminer la sensibilité bactérienne à la Pénicilline. Cette

méthode est fondée sur l'observation princeps de FLEMING qui, dans une boîte de Pétri accidentellement contaminée par un *Penicillium*, observa autour du champignon une place claire sur laquelle le staphylocoque ne se développait pas : la diffusion dans la gélose du produit antagoniste élaboré par le mycelium était responsable de cette inhibition.

C'est en 1945 que MORLEY (14) eut l'idée d'employer des disques secs imprégnés d'antibiotique comme source de la substance active. Par la suite, de nombreuses améliorations furent apportées à cette technique par diffusion (R. MARTIN, Y.-A. CHABBERT, B. SUREAU...) (16).

Les techniques dérivées de la méthode des dilutions furent mises au point ultérieurement. Le dosage Oxford est devenu d'un usage courant à partir de 1940. Quant aux méthodes par turbidimétrie, elles furent précisées par J.-W. FORSTER et B.-L. WILKER (35) et les méthodes s'intéressant au virage d'un colorant sous l'action d'un germe furent utilisées dès 1946. Ainsi PRÉVOT (78), à l'Institut Pasteur de Paris, utilisait, à cette date, la méthode par inhibition du pouvoir réducteur de *Welchia perfringens* sur le vert Janus.

COMMENTAIRES

Il faut remarquer que les résultats de l'antibiogramme ne peuvent être utilisés dans la pratique courante que si l'on pose comme hypothèse de base qu'il n'y a pas de différence de nature entre l'action *in vitro* et *in vivo*. Cette hypothèse n'était pas évidente *a priori*, comme le signale Y.-A. CHABBERT (14) dans l'introduction de son ouvrage sur les Antibiogrammes ; mais les travaux de laboratoire permettent de considérer que l'action *in vivo* est la même, qualitativement, que l'action *in vitro*.

CHAPITRE PREMIER

BASES THEORIQUES

I. — LES ANTIBIOTIQUES ET LEUR MODE D'ACTION

Il est indispensable, avant d'aborder des considérations techniques relatives aux antibiogrammes, de préciser les mécanismes de l'action antimicrobienne des antibiotiques ou du moins de rappeler les théories les plus généralement admises.

Notion d'antibiotique.

On qualifie substance antibiotique, depuis WAKSMAN (85 bis), tout corps, défini ou non, élaboré par un organisme vivant et capable à faible concentration d'inhiber de façon sélective la croissance des micro-organismes. Cependant, en ce qui concerne l'origine de l'antibiotique, cette définition est apparue rapidement trop restrictive. Aujourd'hui, on a tendance à ne plus opposer systématiquement antibiothérapie et chimiothérapie : ainsi, la Chloromycétine élaborée par un organisme vivant est maintenant produite par synthèse sous le nom de Chloramphénicol, sans qu'il subsiste la plus petite différence d'activité entre l'antibiotique d'extraction et l'antibiotique de synthèse.

Mécanisme d'action.

Le mécanisme de l'action antimicrobienne, expliquant comment une substance injectée à dose infime à un organisme animal infecté par des bactéries peut nuire à celles-ci sans nuire à celui-là, est très intéressant à connaître d'un double point de vue :

— intérêt dogmatique, puisque la mise en évidence d'un tel mécanisme correspond à la curiosité scientifique de l'esprit humain ;

— intérêt pratique, comme le signalaient récemment GODFRAIN et MILHAUD (38), car la connaissance d'un tel processus sert de guide pour la recherche des conditions optimales d'utilisation, pour la préparation éventuelle de substances artificielles douées de propriétés analogues, pour l'interprétation valable de certaines manifestations « aberrantes » révélées par l'antibiogramme.

Les premières recherches au sujet du mécanisme d'action des antibiotiques furent entreprises sur la Pénicilline dans les années suivant sa découverte. Les premiers résultats furent publiés à partir de 1947 et furent le point de départ de nombreuses recherches. Pour chaque antibiotique étudié, les résultats obtenus sont très disparates et leur interprétation souvent difficile. Les réactions du métabolisme bactérien constituent un tout indissociable : on dit qu'elles sont intégrées ; la modification d'une réaction donnée se traduit par une série d'effets secondaires et il est très difficile de dégager le *primum movens*. C'est parce que celui-ci n'a pu être approché que pour un petit nombre d'antibiotiques que la systématisation de ces mécanismes d'action est particulièrement délicate et fréquemment remise en cause.

Nous allons essayer de dégager les points essentiels des travaux effectués jusqu'à ce jour, qui conduisent à la répartition des antibiotiques en cinq groupes principaux en fonction de leur mode d'action (41).

A) Inhibition de la synthèse d'un constituant important de la cellule

1° Action sur un constituant de la paroi.

Les bactéries en voie de prolifération se lysent en présence de Pénicilline dans un milieu incapable de les protéger contre les variations de pression osmotique. LEDERBERG (38), le premier, en 1956, a montré qu'*Escherichia coli* n'est pas détruit en présence de Pénicilline si des ions Mg^{++} et du glucose sont ajoutés au milieu ; il se forme alors de grosses cellules sphériques ou ovoïdes, les « sphéroplastés », possédant seulement quelques fragments de parois, qui sont osmotiquement sensibles et ne peuvent se multiplier mais sont capables de donner naissance à des germes analogues aux germes de départ après le retrait de la Pénicilline. (Notons dès à présent que le problème de la « résistance » est quelque chose de relatif). De même, les bactéries Gram +, maintenues en présence d'une substance capable d'équilibrer la pression osmotique dans le milieu extérieur, comme le sucre, prennent une forme arrondie que l'on nomme « protoplastes », qui sont capables de se multiplier dans des conditions de milieu favorables. Il semble donc que les bactéries traitées par la Pénicilline s'arrêtent de synthétiser leur paroi cellulaire, ce qui explique les phénomènes osmotiques (53).

Bien plus, on s'est efforcé de prouver que la lésion de la paroi cellulaire permettait d'expliquer les autres perturbations métaboliques constatées — en particulier l'inhibi-

tion (travaux de HANCOCK et PARK (38) — phénomènes qui apparaissent dès lors comme des effets secondaires. Quant au mécanisme intime responsable de l'arrêt de la synthèse de la paroi cellulaire, il a fait l'objet de nombreuses théories. Cependant, à la suite des travaux de MACHEBŒUF et GROS (1951) (38) d'une part, et de PARK et JOHNSON (1949) (38, 62) d'autre part, l'hypothèse de l'inhibition d'un système enzymatique indispensable à la biosynthèse de la paroi cellulaire des micro-organismes sensibles est classiquement admise. La Pénicilline, qui présente des analogies de structure avec l'acide diamino pimélique — constituant spécifique du monde bactérien et précurseur de la lysine — inhiberait la synthèse de cet acide aminé.

Notons, en conclusion, que l'inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire des bactéries sensibles rend compte de la spécificité et de l'absence de toxicité, car cette paroi cellulaire est un édifice macromoléculaire bien particulier, caractéristique des germes Gram +.

Dans ce même groupe, il convient de ranger le mode d'action de la Bacitracine (travaux de GALE et FOLKES en 1953) (87). La Bacitracine entraîne, elle aussi, la formation de sphéropastes en milieu hypertonique. Notons que cette analogie dans le mode d'action entre la Bacitracine et les Pénicillines peut expliquer un phénomène dont nous parlerons ultérieurement : la résistance croisée.

Signalons encore que l'on a essayé de faire du noyau thiazole, que l'on trouve chez ces deux antibiotiques, le support de cette action commune. Nous classerons également ici la Cyclosérine et l'Oxamycine (travaux de HAHN et PARK) (37, 38, 95).

2° Action sur les protéines plasmatiques.

On étudiera ici, en fait, le mode d'action du Chloramphénicol (58), qui est sans action sur la biosynthèse de la paroi des germes sensibles et ne provoque pas l'émission dans le milieu extérieur des constituants intracellulaires.

Dès 1953, GALE et FOLKES (37) ont montré que le Chloramphénicol provoquait une perturbation du métabolisme des protéines chez le Staphylocoque. Depuis HAHN (1954) (38), on admet que la spécificité du Chloramphénicol est liée à sa structure stéréochimique, ce qui permet d'expliquer que, des quatre stéréo-isomères du Chloramphénicol, un seul, le dérivé D-thréo, est antibiotique, les autres étant inactifs. Quant au mécanisme intime, il n'est pas connu avec certitude ; retenons simplement, après les travaux de BRACHET-GALE-FOLKES (38), que la perturbation se produirait au niveau de la dernière phase de la biosynthèse des protéines, phase se produisant à l'intérieur des ribosomes (qui sont des microsomes riches en A.R.N. fortement polymérisés) et sous le contrôle des A.D.N. du noyau.

Signalons que le Chloramphénicol présente le phénomène de résistance croisée avec les Tétracyclines. Au contraire, son action est inhibée par la Pénicilline et la Streptomycine ; et, inversement, l'inhibition de la synthèse des protéines plasmatiques par le Chloramphénicol protège complètement les bactéries des effets lytiques de la Pénicilline. Il y a là un exemple du mécanisme biochimique d'un antagonisme entre deux antibiotiques (45, 102).

B) Modification de systèmes enzymatiques importants dans la production d'énergie

Le mode d'action de la Streptomycine envisagé ici est celui pour lequel on possède le moins de renseignements malgré les très nombreux travaux réalisés (32).

La Streptomycine entraîne la disparition de certains cytochromes et diminue en outre la respiration des bactéries. Elle interviendrait dans le cycle de Krebs de certaines bactéries pour empêcher la condensation du pyruvate et de l'oxalo-acétate en acide tricarboxylique en C7 (travaux de GEIGER et UMBREIT en particulier) (2, 14, 38 et 42).

Il est remarquable que cet antibiotique, ainsi que ceux de la même famille, Néomycine, Framycétine, Kanamycine, se fixent sur les constituants cytoplasmiques qui ont une charge électro-négative : nucléoprotéines, lipoprotéines. Tous les facteurs susceptibles de diminuer la formation de ces complexes, tels qu'une forte concentration ionique et un pH élevé, diminuent l'activité antibiotique. Cette constatation est également valable *in vitro* et particulièrement lors de la réalisation d'un antibiogramme pour laquelle il conviendra de préparer très soigneusement le milieu de culture, puisque toute variation de pH par exemple peut entraîner des interprétations erronées.

En ce qui concerne les Tétracyclines (Chlortétracycline, Oxytétracycline, Tétracycline base, Diméthyl-Chlortétracycline), leur mode d'action serait assez voisin. Elles semblent bloquer directement les transferts d'hydrogène en inhibant des systèmes enzymatiques d'oxydation ou de phosphorylation oxydative fonctionnant en présence de Mg^{++} (6 et 38).

On peut également ajouter à cette liste l'Actinomycine D qui se fixe au niveau des bases guanidiques et empêche les phénomènes de polymérisation ultérieurs.

C) Action sur la membrane osmotique

Nous signalerons, dans ce paragraphe, un groupe d'antibiotiques polypeptidiques comme la Thyrothricine et surtout la famille Polymyxine-Colistine, dont l'activité se

traduit par une fuite des constituants cellulaires consécutive à l'atteinte de la membrane osmotique.

Ce mode d'action rappelle celui des détergents cationiques. Dans un premier temps, aurait lieu la fixation de la substance antibiotique sur la paroi protoplasmique avec modification de la perméabilité de celle-ci (travaux de NEWTON sur la Polyxine B en particulier) (38) ; dans un second temps interviendrait la libération des composés intracellulaires : acides aminés, purines, pyrimidines, phosphates, qui sont normalement concentrés à l'intérieur de la cellule (travaux de GALE et TAYLOR en 1937 (37) et NEWTON (1) plus récemment).

En conclusion, signalons que les travaux d'ERLANGER (38) en particulier ont montré que l'activité antibiotique était liée à une fonction amine primaire libre et ionisée ($-\text{NH}_3^+$), ce qui permet d'expliquer que les détergents cationiques ont un comportement analogue à celui de la Polymyxine et renforcent son action, tandis que les détergents anioniques et certains ions métalliques l'affaiblissent.

Ces considérations montrent la nécessité de connaître l'état d'ionisation des milieux de culture en général et de ceux des antibiogrammes en particulier.

D) Analogie stérique avec des métabolites

Il s'agit essentiellement du mode d'action des sulfamides (33). Ceux-ci sont les analogues stériques d'une co-enzyme vitaminique, l'acide para-amino benzoïque, et empêchent son utilisation pour la synthèse de l'acide folique. Cette vitamine intervenant dans de nombreuses synthèses : uracile, thymine, purine, méthionine, sérine. En

présence de sulfamides, les bactéries s'appauvrissent rapidement en acide folique et cessent donc de fabriquer ces bases et ces amino-acides (1 et 14).

Il existe d'autres analogues stériques du P.A.B. qui agissent comme les sulfamides, l'acide para-amino salicylique par exemple. On cherche actuellement des substances antagonistes de vitamine autres que l'acide folique, qui permettraient de synthétiser toute une nouvelle gamme de substances antibiotiques.

II. — ANTIBIO-SENSIBILITE : BACTERIOSTASE ET BACTERICIDIE

Les résultats de l'action des antibiotiques sur le métabolisme bactérien peuvent se classer en deux grandes catégories : les effets bactériostatiques d'une part, et les effets bactéricides d'autre part. Etant donné une culture microbienne comprenant un certain nombre de bactéries, mise en présence d'une substance antimicrobienne, on dit que cette substance est douée d'« effets bactériostatiques » si on note des altérations des phases de la croissance des bactéries conduisant à un nombre de bactéries inférieur à celui de la croissance totale sans antibiotique mais supérieur au nombre de bactéries initial.

On dira que cette substance est douée d'« effet bactéricide » si l'on observe une mort accélérée des bactéries, conduisant à un nombre de bactéries inférieur au nombre initial.

1° En ce qui concerne la bactériostase

L'étude de l'action des concentrations d'un antibiotique, qui inhibent plus ou moins complètement la croissance, a permis d'inscrire cette action sous la forme d'une courbe

en « S », dite sigmoïde de l'inhibition. Cette courbe sert à définir les deux points limites qui sont les plus couramment utilisés dans la traduction des résultats d'un antibiogramme :

- la concentration minima inhibitrice (C.M.I.) ;
- la concentration inhibitrice 50 %.

Si l'on considère une série de tubes de culture et des concentrations croissantes d'un antibiotique, la C.M.I. correspond au premier tube dans lequel on n'observe pas de croissance visible. Dans la pratique, la lecture très simple de la concentration minima inhibitrice suffit aux besoins courants et il est inutile de faire appel à la notion plus délicate de concentration inhibitrice 50 %.

2° En ce qui concerne l'effet bactéricide

Il a été étudié en fonction du temps et en fonction des concentrations de l'agent bactéricide.

1) En fonction du temps.

On distingue classiquement :

— l'effet bactéricide rapidement léthal pour l'ensemble de la population. Cet effet se rapproche de celui des antiseptiques, le nombre de bactéries diminue rapidement en fonction du temps suivant une fonction linéaire et aboutit à une destruction totale de la population ;

— l'effet bactéricide partiel, augmentant en fonction du temps, que l'on observe pour la plupart des antibiotiques. Dans ce cas, on n'aboutit pas à une stérilisation complète dans le temps habituel des études de laboratoire ; à tout moment, il existe un certain nombre de bactéries

encore vivantes. Notons dès à présent que ces bactéries peuvent être constituées par des souches résistantes (cf. infra) ou par des « survivants » (*persisters survivants* de BIGGER) (14), c'est-à-dire des bactéries « qu'une série de causes multiples difficiles à évaluer et jouant dans des sens différents font échapper provisoirement à la destruction par l'antibiotique ».

In vivo, on rencontre fréquemment le phénomène de persistance microbienne qui se traduit par le fait que le nombre de bactéries survivantes, au lieu de diminuer avec le temps et la concentration, reste constant après une réduction initiale. Ce phénomène serait peut-être dû à un afflux insuffisant d'antibiotique au niveau du foyer microbien, mais plus vraisemblablement on pense que ce phénomène est lié à une activité métabolique faible des bactéries, ce qui les rend inattaquables par les antibiotiques (cf. antibio-supplémentation...). Ce phénomène de persistance qui, du point de vue clinique, est à l'origine des rechutes, est une importante limite de l'antibiothérapie, comme l'a signalé maintes fois Y.-A. CHABBERT (14).

2) En fonction des concentrations.

Pour un temps donné, nous allons également pouvoir considérer différentes notions :

— les concentrations léthales sont les concentrations pour lesquelles, après un certain temps de contact, on n'observe pas de germes vivants dans l'échantillon prélevé ou il y en aura moins que le pourcentage que l'on s'est fixé ;

— l'action bactéricide par palier est un des types d'action les plus fréquemment rencontrés avec les antibiotiques. Dans ce cas, la décroissance du pourcentage de survi-

vants en fonction des concentrations se fait par paliers successifs, l'effet ne variant que pour un certain nombre de concentrations.

De cette notion, nous retiendrons la conclusion pratique formulée par Y.-A. CHABBERT (14) : « Le fait que, pour beaucoup d'antibiotiques, l'effet antibactérien varie peu suivant les concentrations, du moins dans leur échelle clinique pour un temps donné, a l'heureuse influence d'autoriser les tests de laboratoire à simplifier le nombre des concentrations à étudier ».

Ainsi, compte tenu de l'échelle des concentrations d'un antibiotique qui peuvent être obtenues *in vivo*, dans la technique de l'antibiogramme on ne teste l'activité d'un antibiotique que pour une ou deux concentrations, celles-ci étant choisies parmi les concentrations humorales moyennes.

Ces faits relatifs à la bactériostase et à la bactéricidie permettent de comprendre que la réalisation d'un antibiogramme ne constitue qu'un sondage dans un phénomène complexe et que, comme tout sondage, cette méthode a ses limites.

III. — ANTIBIO-RESISTANCE

La notion de « résistance » bactérienne est connue depuis les travaux de KOSSIAKOFF (14), qui s'intéressait, dès 1885, à la résistance des bactéries à l'acide borique. Par la suite, au fur et à mesure des découvertes et mises en application de nouveaux agents chimiothérapiques (sulfamides et antibiotiques), la résistance est toujours apparue comme une des limites essentielles de leur emploi.

A partir des travaux de BRYSON, M. WELSCH et F. JACOB (97), nous pouvons distinguer quatre aspects différents de la résistance bactérienne :

1° Résistance à partir d'un individu microbien par mutation.

2° Résistance par modification de la souche microbienne (induction de son métabolisme par l'agent chimiothérapique).

3° Résistance par sélection de souches résistantes dans une espèce bactérienne.

4° Résistance par modification de flore.

Cette classification fait intervenir un certain nombre de notions de génétique microbienne ; il convient de préciser la notion de mutation en particulier. A. LWOFF et F. JACOB (14) définissent une mutation comme un changement dans le patrimoine héréditaire, c'est-à-dire dans le génotype, qui est le résultat du fonctionnement des gènes indépendamment de toute action du milieu extérieur. La mutation se traduit alors par l'apparition soudaine, dans une population jusque-là homogène, d'individus différents susceptibles de transmettre à leur descendance le caractère qui les distingue du type normal.

A) Résistance par mutation d'un individu bactérien ou clône

1) Considérations théoriques.

Nous savons déjà, d'après la définition de la mutation, que ce type de résistance doit préexister à l'action de l'agent chimiothérapique et que cet agent ne joue aucun

rôle dans l'apparition de la résistance ; il n'est qu'un agent révélateur ou mieux sélecteur. Ce type de résistance possède encore les autres caractères des mutations.

— Ces cas de résistance sont rares : leur taux est de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-9} (qui est le taux habituel des mutations chez les êtres supérieurs).

— Ces cas de résistance sont stables. Le caractère résistant une fois acquis se transmet aux générations ultérieures. Notons qu'à l'échelle de la Microbiologie, on admet qu'une génération nouvelle apparaît toutes les 30 minutes, ce qui explique la révélation précoce du phénomène.

— Ces cas de résistance sont spécifiques, c'est-à-dire que le caractère résistant n'intéresse qu'un seul agent chimiothérapique défini et que la sensibilité du germe vis-à-vis des autres agents demeure totale.

— Ces cas de résistance sont indépendants. Des études statistiques ont montré que la probabilité que possède un germe d'acquérir simultanément (c'est-à-dire durant la même division) un état de résistance vis-à-vis de deux antibiotiques suit la loi d'indépendance du calcul des probabilités : « On dit que deux événements E_1 et E_2 sont indépendants en probabilité, si la probabilité de leur intersection est égale au produit des probabilités de chaque événement pris séparément » ; ce que l'on peut écrire :

$$\Pr \{ E_1 \text{ — } E_2 \} = \Pr \{ E_1 \} \times \Pr \{ E_2 \}$$

Notons que cette indépendance des événements « acquisition de la résistance » est une justification théorique des associations d'antibiotiques.

Tous ces caractères confirment la correspondance d'un des mécanismes de l'antibio-résistance avec un phénomène

de mutation spontanée. Cependant, ce mécanisme n'est pas le seul en cause et nous pouvons affirmer avec WELSCH (99) :

« Considérer la mutation spontanée avec sélection secondaire comme un fait démontré ne signifie pas qu'il convienne d'écarter la possibilité d'autres mécanismes ».

2) Considérations pratiques.

Les types de résistance. — L'apparition des clones résistants dans une expérience donnée peut se faire selon plusieurs modalités qui définissent différents types de résistance.

Lorsqu'on travaille avec des concentrations supérieures à la concentration minima inhibitrice (C.M.I.), les colonies résistantes observées peuvent présenter certains caractères.

— Repiquées et étudiées, ces colonies présentent toujours un taux semblable de résistance : on parle de résistance obligatoire à un seul échelon.

— Le plus souvent, on n'obtient pas dès le premier essai des mutants résistant à des taux élevés mais une assez grande proportion de clones résistant à des taux légèrement supérieurs à la C.M.I. Repiquées et étudiées, ces colonies peuvent montrer des mutants d'un taux plus élevé et, d'échelon en échelon, on pourra arriver à une résistance importante : on parle de résistance en multiples échelons.

Le danger de ce type de résistance réside dans la valeur du premier échelon qui peut être très élevé et capable de soustraire la souche aux taux thérapeutiques.

Nous voyons apparaître ici l'intérêt de considérer les taux thérapeutiques d'un agent antibactérien pour interpréter les résultats du laboratoire. Ce sera nécessaire avec

certaines antibiotiques vis-à-vis desquels la résistance se manifeste avec un premier échelon élevé : Erythromycine, Spiramycine, Oléandomycine, Novobiocine et Rifamycine.

La résistance croisée. — C'est une notion liée à la spécificité de la mutation, celle-ci affectant un caractère déterminé à l'exclusion de tout effet sur des caractères dépendant d'autres mutations (68). Cependant, la spécificité de ce type de résistance ne s'exerce que pour ce que l'on appelle des « familles » d'antibiotiques. Au sein d'une famille ou d'un groupe de familles, la spécificité n'est pas stricte et la résistance à un membre de la famille entraînera plus ou moins la résistance à un autre membre. A l'intérieur de chacune des familles, on observe un certain degré de *résistance croisée*, alors qu'entre les différentes familles, par définition il n'y a pas de résistance croisée.

Citons quelques-unes de ces familles :

1. Pénicillines (Pénicilline G, V, Méthicilline, Oxacilline, Ampicilline).
2. Oligosaccharides (Streptomycine, Néomycine, etc...).
3. Antibiotiques à large spectre (Tétracyclines, Chloramphénicol).
4. Macrolides (Erythromycine, Spiramycine, etc...).

Exemple : Un clone résistant à la Pénicilline G présentera une certaine résistance à l'Ampicilline ; cependant, leurs degrés de résistance ne seront pas nécessairement identiques à cause, en particulier dans ce type de résistance, des valeurs du premier échelon qui seront vraisemblablement différentes.

Au laboratoire, lorsque l'on étudie la sensibilité d'un germe, on le teste pour au moins un antibiotique de chacune des familles. Ce regroupement des antibiotiques permet

d'ailleurs de se faire une idée du spectre de sensibilité d'un germe sans utiliser la gamme complète des antibiotiques disponibles.

B) Résistance par induction d'enzyme : la pénicillinase

Dès 1940, ABRAHAM et CHAIN (1) montrent qu'il existe dans certaines bactéries un facteur antagoniste de l'action de la Pénicilline et l'appellent la pénicillinase (52).

POLLOCK (38) a précisé son caractère d'enzyme inducible par la Pénicilline ; cette induction est proportionnelle dans certaines limites à la quantité de Pénicilline et continue ensuite pendant plusieurs générations sans Pénicilline et revient lentement à la normale.

L'Oxine et le Chloramphénicol, qui sont des inhibiteurs de l'induction, bloquent la production de pénicillinase au taux atteint au moment où on les ajoute. Ce caractère production de pénicillinase est propre à certaines souches et les mutations sont fort rares. Il est remarquable que les bactéries productrices de pénicillinase résistent par cette seule production d'enzyme et soient aussi sensibles que les bactéries non productrices si la teneur en pénicillinase est insuffisante. C'est le cas lorsque ces souches sont ensemencées en petit nombre, d'où l'importance que revêt l'inoculum dans les tests de sensibilité.

Notons enfin que les colonies productrices de pénicillinase, par l'intermédiaire de cette enzyme diffusible, détruisent la Pénicilline autour d'elles et peuvent permettre la croissance d'une bactérie en réalité sensible : c'est le phénomène du satellitisme, qui peut quelquefois fausser un test.

Seul un opérateur suffisamment averti peut prévoir ces « difficultés » et les infirmer ou les confirmer grâce aux tests qui sont à sa disposition : tests de Ingram, de Barber, pour la recherche de la pénicillinase ; test de Gots pour la mise en évidence du satellitisme.

C) Sélection de souches résistantes dans une espèce bactérienne

C'est en 1947, en Angleterre, que Mary BARBER (14), et un peu plus tard, en 1948, en France, René MARTIN (14), attirent l'attention des laboratoires sur l'augmentation du pourcentage des Staphylocoques producteurs de pénicillinase en milieu hospitalier. Cette évolution d'une espèce bactérienne vers la résistance a entraîné, à l'époque, des affirmations pessimistes sur l'avenir des antibiotiques.

C'est par l'intermédiaire des antibiogrammes que l'on a pu suivre cette évolution ; on s'aperçut qu'à l'intérieur d'une espèce microbienne, il existe généralement des variétés génotypiquement distinctes quant à leur sensibilité naturelle aux antibiotiques. Ces variétés les plus résistantes auront tendance à être sélectionnées. La sélection des souches résistantes apparaît toutefois pour le moment comme un phénomène de micro-évolution locale ; elle a conduit cependant à une « politique d'emploi » des antibiotiques — emploi cyclique de certains antibiotiques, associations antibiotiques.

Cette tendance à la sélection de souches résistantes est plus ou moins marquée selon les espèces. Certaines espèces, comme *Staphylococcus*, *Escherichia Coli* (entéro-pathogène), *Pseudomonas aeruginosa*, *Gonococcus*, laissent apparaître un certain nombre de souches au cours des traitements. D'autres espèces, telles que les Streptocoques

du groupe A, les Pneumocoques, les Méningocoques, les Salmonelles, Brucelles, ne permettent pas d'observer une évolution caractéristique vers la résistance.

D) Sélection d'espèces résistantes dans les flores complexes

L'effet général des antibiotiques est de faire disparaître les espèces sensibles et de les remplacer par des espèces de plus en plus résistantes, pour aboutir finalement à l'apparition de levures ou de champignons qui échappent aux antibiotiques antimicrobiens.

1) L'usage des antibiotiques non adsorbables par voie intestinale entraîne des modifications de flore avec, en particulier, augmentation du nombre des levures qui peuvent être dangereuses. Cependant, dès la fin de l'administration, la flore normale se reconstitue extrêmement vite.

2) Différentes sont les conséquences de l'administration prolongée, per os, des antibiotiques adsorbables par voie intestinale conduisant à la sélection des espèces les plus résistantes.

Ces espèces peuvent être directement pathogènes : c'est le cas dans le syndrome toxique consécutif à l'absorption de Tétracyclines sélectionnant des Staphylocoques entérotoxiques. Ces espèces peuvent être à l'origine d'un dysfonctionnement intestinal se traduisant par un syndrome coprologique bien connu : la diarrhée par antibiotiques.

En Médecine vétérinaire, ce phénomène de sélection de flore se rencontre dans les enzooties de Klebsiellose, que l'on a pu qualifier de « maladies opportunistes ».

3) La sélection constante des espèces les plus résistantes entraîne-t-elle une modification de l'étiologie bactérienne des maladies ?

— Selon Y.-A. CHABBERT (14), il est incontestable que, dans les laboratoires, on observe une diminution des germes spécifiques et que l'on voit proliférer des espèces qui étaient loin, il y a quelques années, de retenir l'attention de la même façon. On peut donc parler de germes d'avenir ; on peut envisager une menace due à la constatation que des espèces qui ne sont pas strictement saprophytes d'une espèce animale prennent actuellement la vedette ; mais rien ne nous permet de conclure à un danger actuellement pour la Santé publique.

— C'est également l'opinion de E.-J.-L. LOWBURY (61), qui signale qu'on a reproché aux antibiotiques d'augmenter la résistance des germes pathogènes, d'en favoriser la virulence et d'augmenter ainsi les infections dans les hôpitaux, mais que, d'après les recherches plus récentes, une telle recrudescence des infections n'existe pas.

— Cependant, il semble que ces résultats optimistes ne soient pas applicables au bacille tuberculeux, selon les travaux récents de E. BERNARD, B. KREIS et coll. (4 bis). Ceux-ci ont pu constater que, pour ce bacille, la fréquence actuelle des souches résistantes à un au moins des trois médicaments standard est d'environ 58 % et 14 % aux trois médicaments à la fois (Streptomycine, Isoniazide, P.A.S.). Cette fréquence de la résistance s'est accrue en 1955 et en 1956.

En conclusion, s'il convient de ne pas considérer la résistance des germes aux antibiotiques comme une évolution inéluctable, il faut avoir présente à l'esprit son éventualité à la suite de traitements inadaptés ou mal conduits.

CHAPITRE II

TECHNIQUES GENERALES DE L'ANTIBIOGRAMME

Section I

DIFFERENTS TYPES D'ANTIBIOGRAMMES

Il existe deux grands types de techniques pour les antibiogrammes :

- les méthodes de dilution en milieu solide ou liquide ;
- les méthodes de diffusion en gélose.

Pour l'étude des principes généraux gouvernant ces deux méthodes, nous nous inspirerons très largement des travaux de M. Y.-A. CHABBERT et spécialement de son ouvrage : « L'Antibiogramme » (Editions de La Tourelle) et des éléments qu'il a bien voulu nous communiquer verbalement.

I. — Les méthodes de dilution

1° Définition.

Ces méthodes consistent à incorporer directement l'antibiotique à des séries de milieux liquides ou solides qui serontensemencés avec les germes à tester.

2° Gammes de dilution.

Pour déterminer l'ordre de grandeur de la sensibilité, il convient d'établir des gammes de dilution de l'antibiotique : le matériel se présentera donc comme une série de milieux de culture liquides ou gélosés de concentrations en antibiotique différentes. La concentration en antibiotique s'exprime en microgrammes (m.cg, μ g, γ) par millilitre de milieu (ml, cm³). Il existe une exception concernant la Pénicilline G dont la concentration s'exprime en Unité Oxford.

Ces gammes de dilution doivent couvrir une étendue suffisante pour englober l'échelle habituelle des concentrations obtenues dans l'organisme (cf. concentrations humorales). Pratiquement, cette échelle est couverte avec une dizaine de milieux pour un test, dont les concentrations seront respectivement 100 ; 50 ; 25 ; 12 ; 6 ; 3 ; 1,5 ; 0,75 ; 0,37 ; 0,18 μ g/ml.

Pour la Pénicilline G, on fait commencer la gamme à 1 U.O./ml.

La réalisation de ces gammes de dilution est assez délicate et peut même s'avérer fastidieuse ; par ailleurs, une technique manquant de rigueur entraîne une précision illusoire. Nous verrons, dans la deuxième partie de ce travail, une solution élégante à ce problème, proposée par l'Institut Pasteur.

Classiquement, de telles gammes sont réalisables à partir de solutions-mères très simples, dont le titre sera de 1.000 μ g/ml. Ces solutions-mères, à quelques exceptions près (Pénicilline G, Auréomycine), sont assez stables et, sous certaines conditions de température, peuvent être conservées de deux à quatre semaines sans risques. La

manière de réaliser ces dilutions varie selon les habitudes de chaque laboratoire, mais on distingue trois possibilités ; on utilisera toujours des tubes de 12 mm de diamètre avec 5 à 10 ml de milieu, car la considération du volume de milieu par rapport à la capacité du tube n'est pas indifférente.

— *Dilution par entraînement* : Cette méthode consiste à prendre une série de 10 tubes, dont le premier contient 9 ml de milieuensemencé et les suivants 5 ml. Un ml de la solution-mère à 1.000 $\mu\text{g/ml}$ est ajouté au premier tube. Après agitation, on prélève 5 ml que l'on reporte dans le second tube et ainsi de suite jusqu'au dernier tube.

En milieu gélosé, le principe est identique, mais il faut faire une première gamme en eau distillée.

— *Dilution sans entraînement* : Elle correspond à la distribution d'une solution d'antibiotique sous un volume variable, complémentée à volume constant par un même liquide sans antibiotique. On ajoute ensuite un volume constant de milieuensemencé.

— *Dilution à volume variable* : Bien qu'en principe le rapport entre volume du milieu et volume total doive être constant pour une série de tubes, on tolère des variations quand elles sont inférieures à 10 %. Ainsi, on peut répartir dans les deux tubes un volume de 10 ml de milieuensemencé et y ajouter des quantités de solution-mère allant de 1 à 0,0125 ml.

3° Inoculum.

En milieu liquide, il est très important que tous les tubes reçoivent la même quantité de bactéries. Cet inoculum doit être tel que l'on ait de 10^4 à 10^6 bactéries

par ml de milieu final. Sur un milieu solide gélosé, la dilution devra être telle qu'elle permette d'obtenir des colonies très serrées mais non pas un film continu.

4° Milieu de culture.

Il a un rôle fondamental et rend délicates les tentatives de standardisation car sa composition est souvent mal définie. Il existe dans le commerce toute une série de milieux plus ou moins adaptés à l'étude de telle ou telle espèce microbienne, tel ou tel antibiotique.

Citons les milieux Difco, B.B.L., l'eau peptonée glucosée au Rouge de Phénol, le bouillon standard, etc... On pourra consulter à ce sujet : CASSAGNE, « Milieux de culture » (11).

5° Incubation et lecture.

Les cultures sont placées à 37° C et le temps de lecture est de 18 à 24 heures pour la majorité des bactéries. Certains auteurs ont signalé que, pour certains antibiotiques peu stables, il y avait intérêt à ensemencer des bactéries dans leur phase de croissance exponentielle et effectuer la lecture au bout de 6 heures.

L'interprétation des résultats doit distinguer la technique en milieu liquide et la technique en milieu solide.

En milieu liquide, on peut rechercher deux choses :

— la concentration minima inhibitrice d'une part qui consiste à repérer la première concentration qui empêche complètement la croissance visible :

— la concentration inhibitrice 50 : dans ce cas, on bloque la croissance dans tous les tubes en ajoutant 1 ml d'une dilution de formol au 1/100 et on repère la densité optique de la culture au photomètre. On traduit ensuite ces opacités en pourcentage d'inhibition et, pour des raisons statistiques, on ramène les résultats à la concentration inhibitrice 50.

En milieu solide, les résultats sont jugés :

+ si, pour une concentration déterminée, la croissance des colonies est identique à la croissance du témoin ne contenant pas d'antibiotiques ;

± si une concentration donnée entraîne une diminution du nombre et de la taille des colonies ;

0 si une concentration donnée inhibe complètement la croissance.

La première concentration inhibant complètement la croissance est dite Concentration Minima Inhibitrice (C.M.I.).

II. — Les méthodes de diffusion

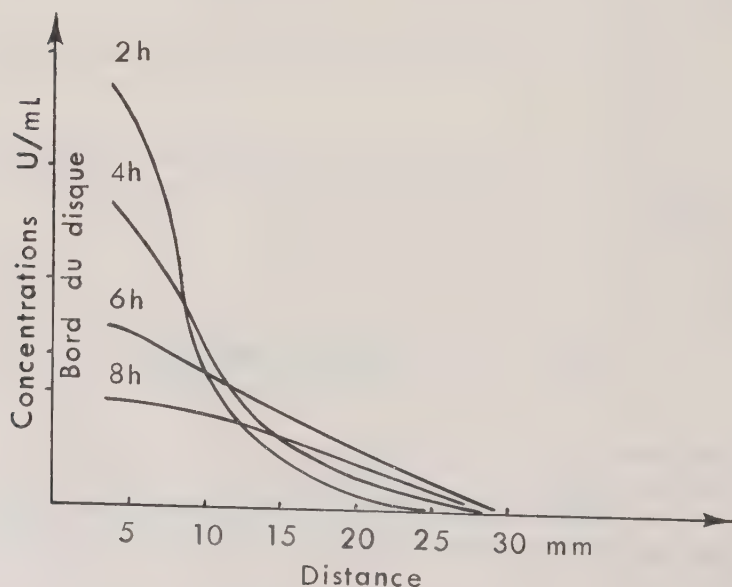
1° Définition

Cette méthode utilise le phénomène physique d'après lequel une force s'irradie autour d'un point en un champ sphérique.

HEATLEY (1941-1944) (43) appliqua le premier le principe de la diffusion en gélose au dosage de la Pénicilline.

2° Lois de la diffusion en gélose. Notion de gradient.

Si l'on verse une goutte de solution aqueuse de colorant sur une gélose d'une boîte de Péri, on remarque que le colorant au départ va diffuser dans trois dimensions en donnant une teinte dégradée. En fonction du temps, le colorant diffuse dans un volume de plus en plus grand, tandis que la concentration du colorant au niveau de la source s'affaiblit. Pour les tests de sensibilité, il était donc intéressant de se faire une idée des concentrations en antibiotique en fonction du temps et de la distance de la source. Grâce aux travaux de HOETTE et STRUYK (1958) (14), on a pu établir que les courbes indiquant la variation de la concentration d'antibiotique en fonction de la distance de la source ont l'allure des courbes ci-dessous.



Ce sont des courbes en cloche de plus en plus étalées en fonction du temps.

Pour un temps donné, il y a donc un gradient de concentrations inversement proportionnelles à la distance de la source. Nous concluons de ces études et en employant les propres termes de M. Y.-A. CHABBERT : « Une bactérie ensemencée à la surface de la gélose subit des concentrations variables exactement comme dans une gamme de dilution en milieu gélosé. Pour les concentrations supérieures à la Concentration Minima Inhibitrice, il y aura une zone d'inhibition qui sera circulaire dans le cas d'un disque ; le diamètre de cette zone sera plus ou moins grand suivant la sensibilité de la souche ».

3° Concentration au niveau de la source d'antibiotique.

Notion de courbes standard.

Le gradient de concentration qui s'établit dans la gélose dépend de la quantité d'antibiotique au niveau de la source ; le diamètre de la zone d'inhibition dépendra de la concentration au niveau de la source et non pas seulement de la nature de l'antibiotique et de la sensibilité de la souche testée. Compte tenu de ce fait pour un antibiotique donné et une concentration déterminée au niveau de la source, on va pouvoir déterminer certaines relations existant entre le diamètre d'inhibition et la C.M.I. de souches de sensibilité variable. On établira des *courbes* dites « *standard* ». Pour les différentes souches, les courbes sont toutes parallèles et la pente dépend de l'antibiotique et des conditions d'opération ; et, si on opère toujours rigoureusement dans les mêmes conditions, cette pente sera caractéristique de l'antibiotique étudié et sera fonction en particulier de sa « constante de diffusion ».

Section II

DETERMINATION DE L'EFFICACITE D'UNE ASSOCIATION D'ANTIBIOTIQUES

I. — Intérêt

Les travaux sur la génétique microbienne qui ont, d'une part montré le caractère étroitement spécifique de la mutation supportant la résistance, et d'autre part relié la notion de résistance croisée à celle de familles d'antibiotiques, constituent la justification théorique de l'emploi des associations d'antibiotiques.

Schématiquement, en considérant qu'une bactérie résistante vis-à-vis d'un antibiotique ne voit pas sa sensibilité modifiée vis-à-vis des autres antibiotiques, il est logique de penser que la thérapeutique verra son efficacité croître si elle utilise deux antibiotiques au lieu d'un. Cela revient à admettre que deux antibiotiques additionnent leurs effets. En fait, dans la pratique, le problème s'est avéré plus complexe. A côté de cet effet d'addition dû à ce que l'on appelle une association indifférente, on peut avoir un effet de potentialisation quand l'association est synergique et, inversement, un effet antagoniste pour d'autres associations. Chaque association doit être étudiée en particulier et fera l'objet d'un test de laboratoire qui définira son intérêt thérapeutique (24).

II. — Différents tests de laboratoire

Les tests font une distinction préliminaire entre les antibiotiques plutôt bactériostatiques (Auréomycine, Terramycine, Chloramphénicol, etc...) et les bactéricides (Pénicillines, Streptomycine...). Cette distinction est didactique et ne doit pas être considérée comme une confirmation ou

une infirmation de la règle de JAWETZ et GUNNISON (46), qui prétend que l'on peut associer, avec de bons résultats, deux bactéricides ou deux bactériostatiques, mais qu'il ne faut pas associer un agent bactéricide avec un agent bactériostatique. Cette règle nous paraît actuellement trop schématique.

A) Tests étudiant la bactériostase.

— *Etude photométrique de la croissance.*

On s'intéresse au pourcentage d'inhibition obtenu avec diverses concentrations d'antibiotiques pris d'abord isolément puis associés. Le pourcentage d'inhibition est repéré grâce aux variations de densité optique de la culture. Cette technique susceptible d'une grande précision a été bien étudiée par GARRET et GALLEGRO ainsi que par OSKAM (14).

— *Etude du déplacement de la concentration minima inhibitrice sous l'effet d'une association.*

a) *En milieu liquide*, ces techniques dérivent de la classique technique des dilutions sériées. On cherche à combiner les gammes réalisées avec deux antibiotiques pris isolément de telle sorte que chaque concentration d'un antibiotique se trouve combinée avec toutes les concentrations de l'autre.

Pratiquement, dans un premier temps on établit la C.M.I. pour chaque antibiotique. Dans un second temps, on associe les deux antibiotiques suivant des multiples ou des fractions de leur C.M.I.

— Si l'on obtient une inhibition par association des C.M.I. de chacun, on a indifférence ;

— si l'on obtient l'inhibition par l'association des deux
 $\frac{\text{C.M.I.}}{2}$ on a effet d'addition ;

— Pour des fractions inférieures à la moitié des
C.M.I., l'effet est synergique ;

— Pour des multiples, l'effet est antagoniste.

Cette technique est précise mais trop fastidieuse pour être d'un usage courant dans des laboratoires non spécialisés.

b) *Technique sur milieu gélosé* : C'est une technique mise au point par FLEMING dans laquelle la diffusion de l'antibiotique se fait à partir d'une bande linéaire. On détermine ainsi dans la gélose un gradient de concentrations décroissantes. L'étude d'une association d'antibiotiques se fera en faisant diffuser les deux antibiotiques à partir de deux bandes disposées à angle droit.

Lecture :

Chaque antibiotique donne une inhibition linéaire parallèle à la bande de papier ; le croisement des deux bandes à angle droit donne une inhibition en équerre et l'effet bactériostatique de l'association va se traduire par des altérations de l'angle d'intersection des deux zones d'inhibition.

— S'il y a indifférence, on a un angle droit parfait.

— S'il y a antagonisme, les lignes d'inhibition se rapprochent des bandes de papier, d'une façon symétrique si l'antagonisme est équivalent pour les deux substances testées, d'une façon dissymétrique si l'antagonisme intéresse principalement une des deux substances.

— La synergie se traduira par un arrondi de l'angle d'intersection, la ligne d'inhibition prenant une allure hyperbolique.

Cette technique, assez simple dans sa réalisation et son principe, a la faveur des laboratoires vétérinaires de diagnostic. Cependant, elle manque de précision et ne peut recevoir une interprétation valable que dans des cas bien définis.

B) Tests étudiant l'effet bactéricide.

1) Principe

Les effets bactéricides s'étudient dans des conditions identiques à celles utilisées pour la bactériostase, mais on ne recherche plus la C.M.I. mais la concentration minima bactéricide, qui est appréciée par repiquage sur milieu dépourvu d'antibiotiques (29).

2) Interprétation

— Si, pour avoir Q survivants il faut employer la concentration x de l'antibiotique X , ou la concentration y de l'antibiotique Y , il y aura synergie de l'association $X + Y$ si on obtient R survivants $< Q$ survivants avec des concen-

trations $\frac{x}{2} + \frac{y}{2}$.

— Pour $R = Q$, on aura indifférence.

— Pour $R > Q$, on aura antagonisme.

L'appréciation du nombre de survivants se fait soit en milieu liquide, soit sur gélose. Mentionnons, parmi les

techniques sur gélose, la technique des répliques sur velours (ELEK et coll.) (14) et la technique des transferts sur cellophane (Y.-A. CHABBERT) (14).

Ces techniques restent délicates et n'ont pas encore la place qu'elles méritent en bactériologie vétérinaire.

CHAPITRE III

ELEMENTS D'APPRECIATION DE LA VALEUR D'UN TEST DE SENSIBILITE

Nous retiendrons trois exigences formulées par les techniciens et les cliniciens à l'égard des tests de sensibilité. Nous essaierons de dégager l'intérêt de ces exigences et les principaux cas où elles sont tenues en échec.

I. — CONCORDANCE DES RESULTATS OBTENUS « IN VITRO » ET « IN VIVO »

Intérêt

Ce n'est que dans la mesure où il y a corrélation entre les résultats de l'antibiogramme et les résultats obtenus en clinique que le laboratoire peut orienter efficacement l'antibiothérapie. Si, qualitativement, la concordance des résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* est admise, il existe souvent des variations quantitatives entre le test de laboratoire et son application pratique (70).

Causes des différences quantitatives

1) Causes liées à la pharmacodynamie des antibiotiques.

Absorption. — Introduits par voie générale, certains antibiotiques sont très rapidement absorbés : la Pénicilline en particulier (20 à 30 minutes après injection intramusculaire). D'autres antibiotiques administrés par voie orale ou parentérale sont absorbés en 2 à 3 heures. Il faut noter également que lorsqu'un antibiotique est appliqué sur la peau ou les muqueuses sous forme de pommade, un excipient gras freine la pénétration.

La précocité de l'action antibactérienne des antibiotiques dépend de leur délai d'absorption.

Diffusion. — Selon KUEMMERLE et coll. (54), l'efficacité d'un antibiotique dépend non pas du taux de sa concentration sanguine mais du taux des concentrations dans les divers organes, en particulier ceux qui sont le siège de la maladie.

La concordance des résultats *in vitro* et *in vivo* n'est donc possible que dans les limites des concentrations humorales (75). Si en Médecine humaine les concentrations humorales des antibiotiques sont connues avec suffisamment de précision, en Médecine vétérinaire le comportement des antibiotiques dans l'organisme n'est en général qu'une extrapolation des résultats obtenus dans l'espèce humaine (18). Or, comme l'indique le tableau ci-dessous, les concentrations humorales varient d'un individu à l'autre, si bien que toute transposition de résultats d'une espèce à une autre est sujette à caution.

	Poids de l'animal	Pénicilline Dose injectée I. M.	Pénicilline en U.O./ml de sérum après							
			1 h	4 h	8 h	12 h	16 h	24 h	36 h	48 h
Cheval 1	445 kg	2.000.000 U.O.	0,64	0,20	0,061	0,071	0,071	0,055	0,045	0,00
Cheval 2	410 kg	2.000.000 U.O.	0,42	0,16	0,10	0,055	0,055	0,035	00'0	0,00

d'après Pierre CLAVEL (Thèse Doct. Vét. Lyon 1953)

Par ailleurs, on estime qu'à partir du sang les antibiotiques diffusent dans les différents tissus et organes et qu'en règle générale, le taux qui y est réalisé est inférieur au taux sanguin. Cependant, certains antibiotiques montrent un tropisme pour un organe particulier et on peut les y déceler à des taux élevés, parfois supérieurs aux taux sanguins : il y a donc une véritable concentration (26, 27, 28, 85, 88, 92, 100).

— En ce qui concerne le foie, le taux hépatique pour la Terramycine est deux à huit fois supérieur au taux sanguin (HERREL, 85 bis). De même, l'Erythromycine se concentre dans cet organe (HEILMAN, 1954, 85 bis).

— Pour le poumon, un seul antibiotique présente l'avantage de s'y concentrer : c'est un ester de la Pénicilline mis au point par JENSEN (1950) (85 bis), la Bronchocilline. Le taux pulmonaire peut être douze fois plus grand que le taux sanguin.

— Dans la lymphe, seul le Chloramphénicol paraît avoir la propriété de s'y retrouver à une concentration supérieure à celle du sang (REILLY et coll., 1950) (85 bis).

— Au niveau de la peau, c'est l'Oxytétracycline qui peut réaliser une concentration supérieure au taux sanguin : WELSCH, 1951 (85 bis) (résultats chez le lapin).

— En ce qui concerne les séreuses, elles ne se laissent pas traverser par les médicaments à grosses molécules. La barrière méningée (si importante à considérer dans les méningo-encéphalites de nos Carnivores) se laisserait traverser par le Chloramphénicol (30 à 40 % du taux sanguin), la Tétracycline et, à moindre degré, l'Oxytétracycline. Par contre, l'Auréomycine ne franchit cette barrière qu'à des taux infra-bactériostatiques.

— En ce qui concerne la mamelle, NELKEN et Coll. (85 bis), en 1955, démontrèrent qu'après l'injection de Spiramycine on retrouvait des taux de médicament vingt à quarante fois supérieurs à ceux du sérum sanguin. Cependant, ces résultats obtenus dans l'espèce humaine n'ont pas encore été confirmés en Médecine vétérinaire.

Le clinicien devra avoir toujours présente à l'esprit la mise en garde de J.-J. MUNNIER : « Les données de l'antibiogramme ne dispensent pas le médecin de se poser une question qui domine le diagnostic et le traitement de toute infection bactérienne : quel est le siège de l'infection ? »

Élimination : La vitesse d'élimination est très variable selon les antibiotiques (74). La Pénicilline est l'antibiotique qui s'élimine le plus vite (36 à 48 heures) (13, 91, 92) ; certains antibiotiques s'éliminent avec lenteur (Terramycine, Spiramycine).

L'efficacité de l'antibiothérapie est conditionnée par le rythme d'administration de l'agent anti-bactérien.

2) Causes liées à l'organisme réactionnel.

L'antibiose « *in vivo* » est influencée par l'organisme. MAYOUX et REBATTU (67) affirmaient récemment que le degré de sensibilité des germes aux antibiotiques variait en fonction des réactions de défense de l'organisme et que les conditions chimiques du milieu et de l'organe intervenaient également. Signalons :

— *Le phénomène inflammatoire chronique* : La dynamique du processus infectieux varie selon les germes en cause ; la lenteur d'évolution de certaines infections a pu être rattachée à la propriété qu'ont certains germes de susciter des réactions tissulaires, des remaniements histo-

logiques particuliers ayant pour effet de gêner l'essaimage des germes. Ces tissus que l'on rencontre dans les phénomènes inflammatoires chroniques peuvent gêner la diffusion des substances anti-microbiennes et empêcher d'atteindre la concentration minima inhibitrice au niveau du foyer (41).

Signalons l'utilisation qui a été faite de la Cortisone et de son effecteur hypophysaire, l'A.C.T.H., afin de tempérer l'intensité des phénomènes réactionnels et s'opposer ultérieurement à l'envahissement de la sclérose (21).

Actuellement, on a proposé de faciliter la progression des antibiotiques grâce à l'emploi des enzymes fibrinolytiques (TILLET et GARNIER, 1933) (85 bis) : streptodornase et streptokinase, capables l'une de lyser les caillots de fibrine, l'autre de liquéfier l'acide désoxyribonucléique des noyaux cellulaires. De tels produits sont efficacement appliqués chez l'Homme à la destruction des dépôts fibreux (PASTEUR-VALLERY-RADOT et Claude LAROCHE, 1951) (85 bis). On les a utilisés dans tous les épanchements cloisonnés, dans les suppurations chroniques localisées ; un à deux jours après leur injection, la fluidification est obtenue : les antibiotiques peuvent alors être utilisés avec efficacité (40).

— *L'état d'alerte du système neuro-végétatif* : Pour expliquer la plus ou moins grande précocité du phénomène inflammatoire, on a parlé de réactivité sympathique et lymphatique. Cette notion d'état d'alerte du système neuro-végétatif a été mise en évidence dans la maladie typhique de l'Homme et l'on estime que le phénomène de Koch est imputable à un processus analogue.

Le système neuro-végétatif interviendrait également dans certains hypofonctionnements endocriniens qui favorisent le développement des maladies infectieuses (9, 25, 48, 69).

Causes liées à l'agent pathogène.

La concordance des résultats du laboratoire et de la clinique est souvent tenue en échec lorsque les antibiogrammes sont réalisés à partir de la « flore de sortie ».

— *Flore de sortie post-nutritionnelle* : On connaît les impératifs économiques du monde moderne qui ont astreint les éleveurs à pratiquer sur les animaux d'élevage, le porc en particulier, un dirigisme biologique de plus en plus rigoureux et déterminé l'apparition de ce que l'on a appelé les maladies métaboliques qui peuvent se compliquer de maladies infectieuses « de sortie ».

Ces maladies de la civilisation, fruits d'un déséquilibre neuro-hormonal du terrain, qui éclatent à la faveur d'une quelconque agression (erreur alimentaire, vaccination, transport) doivent être distinguées des maladies bactériennes essentielles. Certes, les germes microbiens interviennent et peuvent déterminer des complications spectaculaires, mais il ne sont que des germes opportunistes (9 et 48).

— *Flore de sortie post-virale* : Il en est de même dans les maladies virales, la « sortie » de bactéries aisément identifiables ne saurait faire oublier le rôle essentiel du virus.

Dans ces deux cas, l'antibiothérapie a une efficacité aléatoire, mais on ne saurait en rendre responsable le test de sensibilité qui, réalisé à partir de la « flore de sortie », a pu guider l'antibiothérapie.

II. — POSSIBILITE DE STANDARDISATION DE L'ANTIBIOGRAMME

Intérêt

Devant un comité d'experts des Antibiotiques, réuni à Genève en 1960, le Docteur DOROLLE (72), Directeur Général Adjoint de l'Organisation Mondiale de la Santé, a souligné

l'importance de la standardisation de la méthodologie des tests de sensibilité bactérienne. Il déclara en particulier que, de toute évidence, il était du plus haut intérêt de réunir des données comparables et sur lesquelles on puisse faire fond concernant la sensibilité et la résistance des bactéries aux antibiotiques dans les différentes parties du monde.

La standardisation d'un test de sensibilité consiste à normaliser ses différents éléments constitutifs et stades opératoires. Elle présente trois avantages :

1° elle aide le clinicien à déterminer la meilleure ligne de conduite à suivre pour le traitement d'une maladie ;

2° elle permet de faire des études comparatives sur la fréquence, l'importance et l'épidémiologie des souches résistantes de bactéries dans différents établissements, régions ou pays (17) ;

3° elle facilite l'interprétation de résultats publiés qui, bien souvent, ne sont pas comparables entre eux.

Causes du manque d'uniformité des résultats (77)

A) Constitution physico-chimique du milieu de culture.

— Potentiel d'oxydo-réduction.

Les conditions d'aéro-anaérobiose influent peu sur certains antibiotiques tels que le Chloramphénicol ; elles sont, par contre, très importantes pour la Streptomycine. Pour s'en convaincre, il suffit d'ensemencer un germe aérobic facultatif, un *Streptocoque* pathogène par exemple, dans une série de tubes de gélose V.F. contenant des quantités croissantes de Streptomycine. Dans la zone d'aérobiose, les bactéries sont inhibées à un taux assez voisin

de celui observé en milieu liquide ; par contre, elles continuent à croître dans la zone d'anaérobiose jusqu'à un taux dix fois plus élevé que le précédent. L'adjonction au milieu de substances réductrices telles que le thioglycollate ou la cystéine diminue aussi l'activité de la Streptomycine. Ce fait est très important, car nous verrons que certains auteurs ont proposé l'adjonction de telles substances au milieu de culture afin d'assurer l'anaérobiose dans les tests propres aux germes anaérobies.

— *pH.*

En dehors du Chloramphénicol, qui est peu influencé par les variations de pH, les autres antibiotiques se rangent en deux catégories :

— ceux qui sont plus actifs en milieu acide : les Pénicillines, les Tétracyclines, la Novobiocine... :

-- ceux qui sont plus actifs en milieu alcalin : Streptomycine, Néomycine, Kanamycine, Spiramycine...

La sensibilité d'un germe peut varier de 1 à 50 entre pH 6 et pH 8 par exemple ; la conséquence est que, dans un test « de routine » étudiant plusieurs antibiotiques simultanément, beaucoup ne sont pas à leur pH optimum (14).

— *Constituants du milieu.*

— Les protéines : leur importance est liée au mode d'action biochimique des antibiotiques. Ainsi, l'action de la Pénicilline, qui ne s'exerce que sur des bactéries en voie de développement intense, sera donc nettement augmentée dans les milieux riches qui facilitent ce développement. Inversement, la Streptomycine se montre plus active sur les milieux pauvres. L'adjonction de sérum animal au milieu modifie l'action de certains antibiotiques (la Novobiocine...).

— Les lipides : leur présence sous forme de savons peut amener des croissances aberrantes ou l'inhibition de l'activité antibiotique.

— Les glucides : ils interviennent entre autres en modifiant la croissance de la culture et le pH du milieu.

— Les sels : ils interviennent en inhibant la phase de fixation dans l'action des antibiotiques de la famille Streptomycine, Néomycine, Kanamycine.

B) L'inoculum.

— *Importance du nombre de bactéries ensemencées.*

Ce nombre influe quantitativement sur la sensibilité. Nous avons déjà signalé antérieurement le cas des bactéries source de pénicillinase.

On ne peut pas cependant dégager de règles précises en ce qui concerne l'inoculum. On admet que, pour une population paraissant homogène, les variations de la C.M.I. sont assez faibles pour la plupart des antibiotiques, lorsque le nombre de bactéries ensemencées se situe dans un certain ordre de grandeur : on adopte généralement un inoculum de 10^5 bactéries par ml. Des inoculum plus faibles, de l'ordre de 10^3 par ml, augmentent nettement la sensibilité, tandis que des inoculum supérieurs à 10^8 par ml la diminuent considérablement (14, 72, 77).

— *Les phases de la croissance bactérienne.*

On distingue plusieurs phases dans la croissance d'une culture microbienne : phase de latence, phase d'accélération, phase de croissance exponentielle, phase de ralentissement, et enfin phase d'arrêt total.

Le temps de latence par exemple joue un grand rôle dans les méthodes de diffusion. Dans ce cas, la dimension de la zone d'inhibition est le résultat d'une compétition entre la vitesse de diffusion de l'antibiotique dans la gélose et le moment où le germe se trouve dans un état tel qu'il est apte à subir l'action de l'antibiotique. Cela nous permet de nous insurger contre l'habitude, qui s'est généralisée, de juger le degré de sensibilité d'un germe exclusivement en fonction de la taille de la zone d'inhibition (98).

Vis-à-vis de l'antibiotique A par exemple, telle culture présentant un diamètre d'inhibition de 20 mm sera dite « très sensible » et telle autre présentant un diamètre de 10 mm sera jugée « peu sensible », alors que toutes deux ont *peut-être* le même degré de sensibilité mais n'ont pas été repiquées et cultivées dans les mêmes conditions. Nous reviendrons ultérieurement sur cette importante question de l'interprétation des tests.

— *L'état de dispersion des bactéries.*

Il interviendrait sur la résistance des germes. On admet que les bactéries groupées en microcolonies ou en amas sont plus résistantes que les populations dispersées dans un milieu liquide, comme c'est le cas dans la plupart des tests de sensibilité.

III. — FACILITE D'EXECUTION ET RAPIDITE

Intérêt

On peut estimer qu'un délai raisonnable de 24 à 48 heures peut être accordé au laboratoire pour qu'il indique si, à des concentrations déterminées, l'antibiotique a des chances d'être actif sur une population microbienne. Toutes

les techniques d'antibiogramme doivent sacrifier à cette exigence ; cet impératif de rapidité explique l'intérêt qu'ont toujours suscité les techniques dites « accélérées ».

Par ailleurs, le protocole de réalisation d'un test doit être suffisamment simple, afin qu'il puisse être effectué avec un matériel peu délicat et par des techniciens susceptibles d'acquérir une formation rapide.

Cet argument est particulièrement important pour la Médecine vétérinaire, qui ne peut s'appuyer que sur des tests peu onéreux (85 bis).

Limites à la rapidité d'exécution d'un test

— Le délai englobe la durée du test lui-même, mais également les opérations préliminaires telles que l'isolement et l'ensemencement des germes. Ces opérations délicates doivent être effectuées avec beaucoup de soin et leur délai ne peut être raccourci.

— Certaines techniques accélérées sont très critiquables et il est fréquent que la rapidité soit obtenue au détriment de la précision.

DEUXIÈME PARTIE

APPLICATIONS :

L'ANTIBIOGRAMME EN BACTERIOLOGIE VETERINAIRE

CHAPITRE PREMIER

LES PRELEVEMENTS

L'examen de sensibilité aux antibiotiques débute avec le prélèvement des matières comportant les germes à tester. Ce prélèvement doit être correctement fait, car, à son niveau, existent déjà de nombreuses causes d'erreurs (7).

I. — REGLES GENERALES

— *Eviter la pollution.*

Cette règle peut sembler superflue puisque, généralement, l'agent responsable de l'infection est associé à une flore variée. Cependant, l'introduction de germes exogènes

est néfaste, soit parce que leur pullulation masque les espèces pathogènes et gêne leur isolement, soit parce qu'ils altèrent le milieu de culture et modifient ses propriétés.

— *Eviter les altérations du produit prélevé.*

Il convient particulièrement d'éviter de laisser séjourner le prélèvement à des températures très élevées ou au contraire très faibles, les germes pathogènes pouvant être thermolabiles.

— *Choix du matériel à prélever.*

Il faut que le prélèvement représente réellement le matériel pathogène.

Les caractéristiques d'un germe (résistance, pouvoir pathogène, etc...) varient en particulier avec leur lieu de développement.

MAYOUX et REBATTU (67) signalent en particulier que la résistance des germes varie d'un endroit à l'autre et que les différences sont importantes selon que les germes sont prélevés dans le pus, les tissus ou le sang. Ils ont même précisé, dans certains cas d'oto-mastoïdite, que la résistance n'est pas la même selon les points où le pus est prélevé.

Expérimentalement, les mêmes auteurs ont montré qu'un même germe inoculé chez différents animaux présentait d'importantes variations dans sa sensibilité à un traitement antibiotique selon le niveau de son prélèvement. Ils expliquent cet état de chose par le fait que les germes qui se multiplient rapidement (dans le sang et dans les tissus nobles) ont une sensibilité accrue, alors que dans le pus les germes sont très modifiés et voient leur résistance transformée et généralement augmentée.

— *Moment du prélèvement.*

Le prélèvement doit, en principe, être effectué avant que l'on ait institué une thérapeutique directement antimicrobienne et, dans le cas où l'échantillon provient d'un animal déjà soumis à une intense chimiothérapie, il convient de le signaler ; on pourra, lorsque c'est possible, introduire un antidote spécifique dans le milieu de culture (acide p-aminobenzoïque pour neutraliser les sulfamides, pénicillinase pour détruire la Pénicilline, etc...).

Il est opportun d'effectuer le prélèvement pour hémoculture à la période de pyrexie. De même, la courte bactériémie post-opératoire est intéressante pour l'hémoculture ; par contre, la période post-prandiale est à proscrire.

Pour les urines, il est préférable de faire le prélèvement chez le sujet à jeûn.

II. — PRELEVEMENTS PARTICULIERS

— *Dans le cas des septicémies.*

On peut réaliser des hémocultures. Le test est fait sur la souche pathogène préalablement isolée et demande plusieurs jours.

Chez les petits animaux, on peut réaliser des cultures à partir de la moelle osseuse, le prélèvement étant effectué au niveau du sternum.

Dans les septicémies du groupe « maladie du jeune âge », l'évolution fatale de la maladie est souvent rapide. Le praticien envoie au laboratoire un os long pour myéloculture ; d'autres organes (foie, rate) comportant des éléments du système réticulo-endothélial sont adjoints ; les résultats des tests servent, le cas échéant, à enrayer une enzootie d'étable.

— *En ce qui concerne le pus.*

Dans le cas de lésions fermées, après section des poils, on procède à une antisepsie cutanée et on récolte un peu de la sérosité plus ou moins purulente dans un tube stérile. Au laboratoire, l'antibiogramme sera généralement réalisé sur le pus total, même si une coloration de Gram démontre la présence de plusieurs espèces bactériennes.

— *Dans le cas de lésion ouverte.*

On fait un prélèvement à la limite des tissus sains, de manière à obtenir si possible le germe responsable de la lésion dans un état de relative pureté par rapport aux germes de surinfection.

— *En ce qui concerne les excréments.*

Il convient de recueillir si possible les fragments purulents et sanglants. Le test de sensibilité sera effectué après une dilution en rapport avec la consistance du prélèvement.

— *En ce qui concerne les exsudats (péritonéaux, thoraciques) et les urines*, on utilise le culot de centrifugation.

— *Le lait* est un prélèvement classique en Médecine vétérinaire. Il doit répondre essentiellement aux conditions d'asepsie. Notons que, généralement, on élimine les premiers jets de la traite (31).

Tous ces prélèvements subissent, au laboratoire, certains traitements, spécialement en vue de leur homogénéisation, avant d'être cultivés (10).

CHAPITRE II

TECHNIQUES UTILISEES EN BACTERIOLOGIE VETERINAIRE

Ce chapitre se propose davantage d'établir une vue d'ensemble des techniques utilisées en Bactériologie vétérinaire, que d'en donner une description détaillée, celles-ci étant fort bien décrites dans les recueils spécialisés.

Section I

METHODES CONCERNANT LES BACTERIES AEROBIES

Sous-section 1

METHODES DE DIFFUSION EN GELOSE

On peut faire une distinction entre les techniques de diffusion verticale et les techniques de diffusion horizontale.

I. — LES TECHNIQUES DE DIFFUSION HORIZONTALE

A) Le technique des disques pour l'étude de la sensibilité aux Antibiotiques.

C'est la plus couramment employée.

1° PRINCIPES.

On dépose, sur le milieu de culture ensemencé d'une boîte de Pétri, des disques de papier qui ont été imprégnés avec des solutions de divers antibiotiques et séchés (93). La diffusion de l'antibiotique s'opère à partir des disques et détermine dans la gélose des concentrations décroissantes d'antibiotique. Après culture, chaque disque est entouré d'une zone circulaire où le germe n'a pas poussé. Le diamètre de cette zone permet d'apprécier la sensibilité du germe.

2° MISE EN ŒUVRE.

— *Milieu de culture.*

Nous savons que l'activité des antibiotiques est influencée par un grand nombre de facteurs, parmi lesquels le milieu de culture joue un rôle très important.

Il faut utiliser un milieu standard, dont les éléments protidiques devraient être le plus constant possible. Pour cela, le mieux est, après avoir sélectionné un extrait de viande et une peptone permettant une bonne croissance de la majorité des bactéries, d'en faire un stock suffisant. Ce milieu non tamponné pourra être additionné de glucose pour favoriser la croissance, bien que ce soit un élément perturbateur. Le pH sera ajusté à 7,1 avec le plus de précision possible. Le milieu sera coulé sur une épaisseur de 4 mm.

En pratique, le milieu de culture est réparti en flacons de 45 ml à raison de 28 ml. Le milieu, au moment de l'emploi, est fondu et coulé dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre. Il est préférable d'utiliser des boîtes assez sèches, préparées 24 à 48 heures avant et conservées à 4° C (leur stérilité doit être vérifiée).

— *Inoculum.*

Il faut préparer une dilution du produit soumis à l'examen.

— *Cas d'un germe préalablement isolé* : on part généralement d'une culture de 18 à 24 heures. La dilution est d'autant plus élevée que la croissance du germe est plus faible.

1) Germe type *Staphylococcus Escherichia coli* : on porte une anse dans 10 cm³ d'eau distillée stérile.

2) Germe type *Streptococcus* : on porte 1 à 2 gouttes dans 10 cm³ d'eau distillée stérile.

3) Germe type Méningocoque, *Hemophilus* : dilution au 1/10 ou culture pure.

— *Cas d'un produit pathologique mono- ou plurimicrobien* : après observation microscopique du nombre et de la nature des germes, on effectue une dilution qui permettra d'obtenir des colonies suffisamment isolées pour être observées et éventuellement repiquées et suffisamment denses pour que les cercles d'inhibition soient nets.

Exemples : les urines purulentes doivent être diluées au 1/100, les expectorations riches en germes au 1/10.

— *Ensemencement.*

— On peut l'effectuer par inondation. On inonde toute la surface de la boîte avec 1 ml environ de la dilution choisie, en imprimant à la boîte de Pétri des inclinaisons dans plusieurs directions. On enlève l'excès de liquide en inclinant la boîte et en aspirant l'excès avec une pipette Pasteur.

— Ensemencement à la pipette coudée après avoir porté une goutte de la dilution au centre de la boîte.

— *Pose du disque.*

La liste des différents antibiotiques qui imprègnent les disques pourra être consultée dans l'ouvrage de M. Y.-A. CHABBERT : *L'Antibiogramme*, p. 126 (collection de la Tourrelle). L'auteur y indique, en outre, pour chaque antibiotique, la charge du disque, la zone des taux thérapeutiques obtenue avec les traitements habituels.

Lors de la pose du disque, on peut s'aider d'un graphique-étalon placé sous la boîte de Pétri et qu'on lit par transparence, afin de disposer chaque disque rationnellement. On peut placer environ 12 disques de 6 mm sur une boîte.

Certains disques doivent être utilisés avec une prédiffusion de 3 heures à la température du laboratoire (environ 20°), mais ceux de l'Institut Pasteur s'utilisent sans prédiffusion. La boîte est placée à l'étuve à 37° C pendant 16 à 18 heures.

3° LECTURE.

Elle tient compte :

— de l'existence de courbes de concordance entre les C.M.I. et le diamètre des zones d'inhibition ;

— des définitions conventionnelles de la sensibilité et de la résistance.

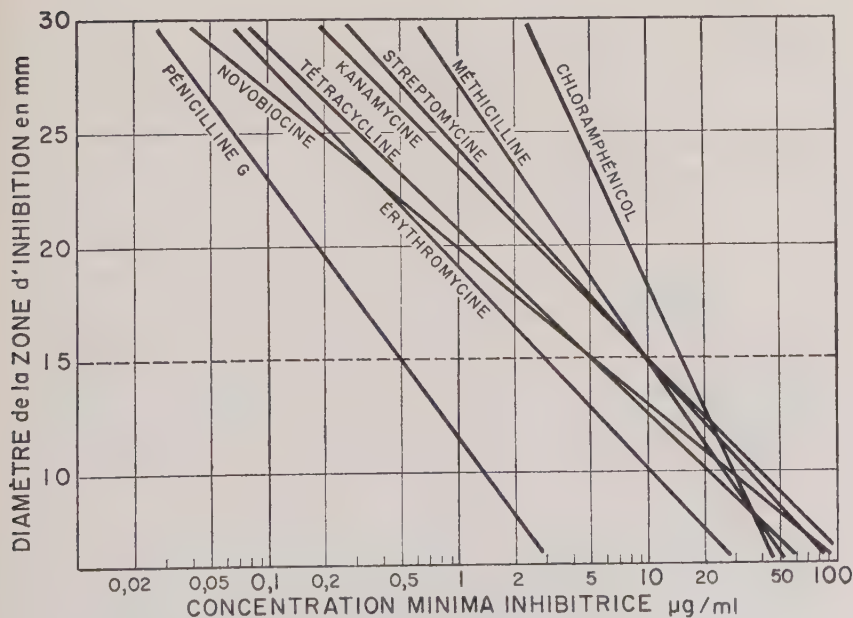
— Nous indiquons, dans le graphique ci-dessous, les courbes de concordance établies pour les disques que l'Institut Pasteur met à la disposition des laboratoires. Elles

permettent d'exprimer le diamètre d'une zone d'inhibition en concentration minima inhibitrice, la souche de référence étant la souche Staphylocoque 209 P. Connaissant la zone des taux thérapeutiques pour chaque antibiotique, on classe les souches en trois catégories :

— les souches dont la C.M.I. est inférieure à la zone des taux thérapeutiques, dites *sensibles* ;

— les souches dont la C.M.I. est au niveau de la zone des taux thérapeutiques, dites *limites* ;

— les souches dont la C.M.I. est supérieure, dites *résistantes*.



Courbes de concordance

B) La technique des disques pour la détermination de sensibilité aux Sulfamides.

1° PRINCIPE.

Il est toujours identique. Cependant, le milieu de culture est particulier et, pour un volume total de 25 ml, doit contenir 2,5 ml d'une solution à 20 % de globules rouges hémolysés de Cheval.

2° ENSEMENCEMENT.

Il est plus délicat, car il faut obtenir sur la boîte des colonies séparées et non une nappc. On dépose à la surface de la gélose quatre disques régulièrement disposés à 1 cm de la périphérie. Ces disques sont marqués d'une lettre qui correspond aux sulfamides suivants :

A : p-amino-phényl-sulfamide (1162 F) Septoplix.

B : p-amino-phényl-thiozol (2090 RP) Thiazomide.

C : p-amino-phényl-sulfamido-méthyl-thio-diazole (Rufol).

D : p-amino-phényl-sulfamido-pyrimidine (2616 RP) Adiazine.

La boîte est portée à l'étuve à 37° C pendant 16 à 18 heures.

3° LECTURE.

Il ne s'agit que d'un test qualitatif et les différences observées entre les sulfamides ne sauraient être considérées comme applicables en clinique et ne peuvent permrttre le

choix du sulfamide, qui reste subordonné aux règles habituelles. Ce test permet d'apprécier la sensibilité d'une souche aux sulfamides en général.

Zones d'inhibition supérieures à 35 mm : souche très sensible.

Zones comprises entre 20 et 30 mm : sensibilité moyenne.

Zones inférieures à 20 mm : sensibilité faible.

Absences de zones d'inhibition : souche résistante.

Les résultats obtenus avec ces quatre sulfamides peuvent être étendus aux autres sulfamides.

C) Technique des cupules en gélose.

Mise au point par CHABBERT et SUREAU (15), elle utilise le même matériel que la technique des disques : un milieu de culture gélosé sur boîte de Pétri. Son originalité consiste à découper dans la gélose, avec un perforateur cylindrique spécial, six cupules qui recevront 3 gouttes des différents antibiotiques considérés. La diffusion s'opère à partir de ces cupules qui tiennent lieu de disques.

Cette méthode fut très employée en Bactériologie avant la mise au point de la technique des disques. Actuellement, elle n'offre plus d'intérêt en tant que test de sensibilité bactérienne, mais est encore employée pour l'étude d'un antibiotique à des concentrations particulières ou pour un titrage rapide du taux sérique des antibiotiques (39, 50).

II. — LES TECHNIQUES DE DIFFUSION VERTICALE

Nous les signalons pour mémoire seulement, n'étant guère employées en Bactériologie vétérinaire.

Elles consistent à introduire la gélose ensemencée dans un tube ouvert aux deux bouts et à mettre au contact l'une des extrémités du tube et la solution d'antibiotique. La sensibilité est mesurée par la profondeur de la zone qui reste stérile (JULIUS, 1950 ; GIORGIO, 1950) (85 bis).

Sous-section 2

METHODES DES DILUTIONS EN SERIE

Ce sont des méthodes quantitatives qui consistent à incorporer l'antibiotique à des séries de milieux liquides ou gélifiés ensemencés.

Ces méthodes, relativement longues à mettre en œuvre et exigeant des souches pures, ne sont pas d'un emploi courant ; cependant on est obligé d'y recourir :

— avec les antibiotiques diffusant mal dans la gélose, comme les antibiotiques polypeptidiques produits par les bactéries (Thyrothricine, Polymyxine, Colistine) (41) ;

— avec les bactéries à croissance lente ; en effet, chaque fois que la croissance normale de la souche ne se fait pas en 16 à 18 heures, les résultats des méthodes de diffusion deviennent difficiles à interpréter (10) ;

— avec les bactéries exigeant des milieux spéciaux qui modifient trop la diffusion de l'antibiotique (10, 11).

Cette technique reste, en outre, l'élément de référence pour les méthodes de diffusion en gélose.

I. — TECHNIQUE EN MILIEU LIQUIDE

1° Préparation des solutions d'antibiotiques.

Nous savons que celles-ci exigent des pesées et des manœuvres fastidieuses. Cependant, Y.-A. CHABBERT (14)

a proposé une méthode élégante pour réaliser les gammes d'antibiotique ; un disque de papier filtre imprégné avec une solution d'antibiotique et séché pourra libérer de nouveau l'antibiotique lorsqu'on l'immergera dans un milieu liquide. L'Institut Pasteur met ainsi à la disposition des laboratoires deux sortes de disques pour chaque antibiotique, les uns servant à préparer des solutions fortes, les autres des solutions faibles.

2° Test sur deux tubes.

On ensemence avec une *culture pure* un flacon de 30 ml de milieu liquide. On distribue pour chaque antibiotique un disque à une concentration forte (voisine de 50 mcg/ml) et un disque à une concentration faible (prise au niveau des taux humoraux les plus élevés) dans 2 tubes de 13 mm de diamètre et on les recouvre, avec une pipette stérile, de 2 ml de bouillon ensemencé. On distribue aussi 2 ml dans un tube témoin.

Après 16 heures à 37° :

— Si la souche ne pousse que sur le tube témoin, elle est dite *sensible*.

— Si la souche pousse aussi sur le tube contenant une concentration faible, elle est dite *limite*.

— Si elle pousse sur les 3 tubes, elle est dite *résistante*.

3° Test sur plusieurs tubes.

Les disques possèdent une propriété intéressante : ils peuvent être doublés ou coupés par moitié ou par quart et libèrent alors des concentrations doubles, $1/2$ ou $1/4$ avec une précision suffisante. Il est donc possible, avec 2 disques à des concentrations différentes, de réaliser de véritables gammes, à condition que le volume total de milieu soit toujours de 2 ml.

	Disque fort			Disque faible		
	1	1/2	1/4	1	1/2	1/4
Chloramphénicol	10	5	2,5	1	0,5	0,25 UO/ml
Pénicilline	50	25	—	10	5	2,5 mcg/ml
Sterptomycine	50	25	—	15	7,5	3 msg/ml
Tétracycline	50		12	5	2,5	1,2 mcg/ml

On lit au bout de 18 heures la première concentration inhibant la croissance visible. Dans la pratique, le repérage de la concentration minima inhibitrice peut se faire par l'observation d'une propriété liée à la croissance de la culture (fermentation d'un sucre avec virage d'un indicateur de pH, etc...).

II. — EN MILIEU GELOSE : METHODE DES STRIES SUR GELOSE

— Cette méthode est très longue à mettre en œuvre puisqu'elle consiste à réaliser une gamme de neuf boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé et un antibiotique dont la concentration varie (de 100 à 0,8 $\mu\text{g/ml}$ pour la Colistine par exemple) ; une boîte de Pétri dépourvue d'antibiotique sert de témoin.

— L'ensemencement est réalisé par des stries à l'aide d'une pipette Pasteur à partir d'une culture de 18 heures en bouillon ordinaire dilué au 1/1.000. On étudie plusieurs souches simultanément sur la même boîte de Pétri.

— La lecture consiste à noter :

- + les concentrations permettant une croissance des colonies identique à celle de la boîte témoin ;

- ± les concentrations entraînant des colonies moins nombreuses et plus petites ;
- 0 les concentrations inhibant complètement la croissance.

On assimile la C.M.I. à la première concentration inhibant complètement la croissance.

Section II

TECHNIQUES POUR ANAEROBIES

Elles peuvent être classées en fonction des procédés employés pour obtenir l'anaérobiose (79, 80).

I. — TECHNIQUE EN MILIEU SOLIDE

A) En milieu profond.

1° TEST DE H. BEERENS ET J. GUILLAUME (2 bis).

Dans cette technique, les disques d'antibiotique sont disposés dans la masse d'une gélose profonde V.F. préalablementensemencée et répartie en tubes ; la zone d'inhibition est fonction de la sensibilité de la souche et se mesure de part et d'autre du disque.

Temps opératoires : 80 ml de milieu V.F. régénéré, glucosé et refroidi à la température de 45° C sont ensemencés avec une dilution de la culture initiale dont la richesse en bactéries a été déterminée.

On répartit le milieu ensemencé dans 5 tubes de 180 × 120 mm à raison de 10 ml environ par tube. On obtient ainsi des masses solides où les anaérobies sont protégés de l'oxygène libre.

Un disque antibiotique est alors déposé dans chaque tube à la surface du culot de milieu solidifié ; on ajoute ensuite à la pipette Pasteur X gouttes de gélose nutritive, qui a pour but de fixer le disque et d'éviter la dissolution de l'antibiotique lors de la coulée de la seconde fraction de milieuensemencé.

On répartit enfin le reste du milieu V.F.ensemencé par quantités sensiblement égales dans chaque tube. L'incubation à 37° a lieu immédiatement pour les bactéries à croissance lente ; après 12 heures de séjour à la température du laboratoire dans le cas de bactéries à croissance rapide.

Dès l'apparition macroscopiques des colonies, on mesure la zone d'inhibition située de part et d'autre du disque.

Résultats, interprétation : Cette méthode ne donne qu'un ordre de grandeur de la sensibilité et ne saurait avoir la précision des méthodes de CHABBERT pour les aérobies.

H. BEERENS (2 bis) a réalisé un étalonnage qui peut être utilisé en Bactériologie vétérinaire et que nous rapportons ci-dessous.

Pénicilline	Zone < 15 mm	souche résistante
	15 mm < Z. Inh < 25 mm	souche douteuse
	Zone Inh. > 25 mm	souche sensible
Auréomycine	Zone Inh. < 20 mm	souche résistante
Terramycine	20 mm < Z. Inh. < 30 mm	sensibilité limite
Chloromycétine	Zone Inh > 30 mm	souche sensible

DE LAVERGNE et coll. (1956) (25 bis) ont choisi pour 10 antibiotiques, 10 souches dont ils ont déterminé les zones d'inhibition et la concentration minima inhibitrice en milieu liquide en utilisant le vert Janus comme indicateur de croissance : ils obtiennent les correspondances suivantes :

	Zone d'inhibition en mm	C.M. I. en μg ou U. O.
Pénicilline	15	0,3 U. O.
	25	0,2 U. O.
Streptomycine	25	10 μg
	30	5 μg
Chloramphénicol	25	15 μg
Tétracycline	20	5 μg
Erythromycine	15	4 μg
	20	2 μg
Spiramycine	20	10 μg
	25	5 μg
Néomycine	30	10 μg

2° TECHNIQUE EN BOÎTE DE PÉTRI (80, 22).

Sur le couvercle d'une boîte de Pétri, on dépose 3 gouttes de gélose fondue, de telle sorte que chaque goutte représente le sommet d'un triangle équilatéral. On colle un disque antibiotique sur chacune de ces gouttes et on laisse la gélose se coaguler. Puis, délicatement, on coule sur l'ensemble une gélose V.F. glucosée encore fluide, ensemencée extemporanément ; il faut que la hauteur de la couche soit d'environ 3 à 4 mm. On repose ensuite à la surface de la gélose encore fluide le fond de la boîte de Pétri que l'on maintient jusqu'à ce que la gélose soit recoagulée.

On scelle à la paraffine l'intervalle entre boîte et couvercle et on porte à l'étuve.

La lecture se fait en général dans les 12 heures pour les espèces à croissance rapide, dans les 24 heures pour les espèces à croissance moyenne et dans les 48 heures pour les autres.

Pour les espèces très gazogènes comme *Welchia perfringens*, il est recommandé d'employer une gélose V.F. additionnée de 3 à 4 % de nitrate de sodium, celui-ci servant d'accepteur d'hydrogène : il n'y a pas de dégagement gazeux qui gêne la lecture.

B) Milieux utilisés en surface.

Ces milieux le plus souvent coulés en boîte de Pétri sont ensemencés comme dans le cas des bactéries aérobies. On dépose les disques antibiotiques en surface comme dans les méthodes pour germes aérobies et l'anaérobiose de la culture est assurée en la plaçant à l'abri de l'oxygène.

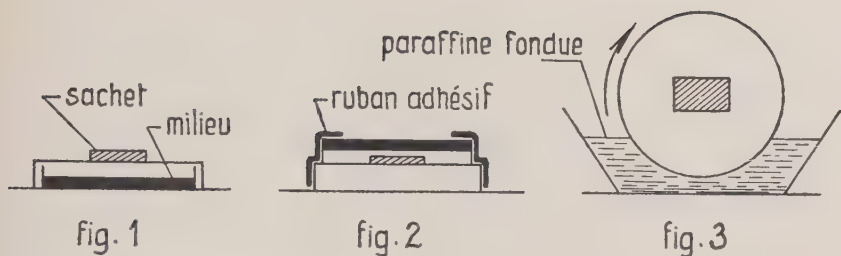
— PROCÉDÉ DE MAC INTOSH ET FILDES (80).

Il consiste à supprimer l'oxygène d'une enceinte fermée (jarre) en le combinant à l'hydrogène pour former H_2O .

— TECHNIQUE AU PYROGALLOL ALCALIN (22, 80).

On réalise l'anaérobiose par le pyrogallol en milieu alcalin à l'intérieur de chaque boîte de Pétri. A cet effet, on fixe sur la partie extérieure du couvercle de la boîte, avec de la paraffine, un petit sachet de 5 à 7 cm confectionné avec du papier filtre et contenant 2 g de la poudre de formule :

Carbonate de Potassium	3 g
Pyrogallol	3 g
Terre d'infusoires	15 g



Le fond de la boîte de Pétri contenant le milieuensemencé est retourné sur le couvercle. Un ruban adhésif fixe les deux parties.

II. — TECHNIQUES EN MILIEUX LIQUIDES

L'anaérobiose idéale est obtenue par culture en tubes scellés sous vide. On peut appliquer alors la méthode des dilutions, qui sera plus précise que les méthodes précédentes.

Ce procédé exige un appareillage important, des manipulations longues et délicates.

Toutes ces méthodes pour anaérobies n'ont pas encore atteint le degré de précision des méthodes en aérobiose et il ne faut guère en attendre plus qu'une élimination des produits réellement inactifs.

CHAPITRE III

INTERPRETATION ET UTILISATION DE L'ANTIBIOGRAMME PAR LE CLINICIEN

I. — INTERPRETATION DES RESULTATS PAR LE CLINICIEN

L'interprétation théorique est aisée, mais il existe quelques cas où la nature particulière du prélèvement pose quelques problèmes au clinicien. Nous insisterons essentiellement sur un problème ayant une grande acuité en Médecine vétérinaire : la flore des animaux recevant une alimentation antibio-supplémentée.

L'usage des antibiotiques n'est plus seulement thérapeutique ; il s'est étendu à de nombreux domaines et surtout à celui de l'alimentation du bétail. Les antibiotiques ajoutés aux aliments des volailles (exception faite généralement pour le canard et l'oie), des porcins, des ovins et des bovins, activent l'engraissement en réduisant les frais d'exploitation.

La gamme des antibiotiques utilisés à cet effet est très étendue ; les plus utilisés sont la Pénicilline, la Chlortétracycline et l'Oxytétracycline, à des doses croissantes depuis dix ans. Ces substances sont parfois utilisées sous forme d'associations, leur efficacité se trouvant ainsi potentialisée,

comme semblent l'indiquer les résultats obtenus par FERRANDO et JOUBERT (20, 46 bis) avec un mélange de Pénicilline et d'Auréomycine. Ces substances connaissent une telle vogue qu'en 1952, on estima la quantité d'antibiotiques utilisée aux U.S.A. pour l'alimentation des animaux égale sinon supérieure à celle utilisée pour la thérapeutique.

Notre propos n'est pas de nous demander si une telle vogue est justifiée ni d'envisager les répercussions de telles pratiques sur la Santé publique (73) ; il consiste à savoir si l'antibio-supplémentation de la ration alimentaire affecte les tests de sensibilité bactérienne.

Les faits.

Le mode d'action des antibiotiques sur la croissance a fait l'objet de très nombreux travaux, dont les conclusions sont d'ailleurs souvent contradictoires.

— Pour certains auteurs, la stimulation de croissance est due à une action d'épargne portant sur l'énergie, l'azote et certaines vitamines. Citons les travaux de LUDVIGSEN et THORBECK (36) sur la rétention du carbone et l'accroissement de Q.R. ; les travaux de FORBES, RUSSO et ZELTER (36), qui mettent en évidence l'accroissement du coefficient de rétention azotée ; ceux de SHENDEL et JOHSON (36), sur l'action d'épargne pour les vitamines du groupe B.

Dans cette théorie, les antibiotiques auraient une action directe sur l'hôte.

Pour d'autres auteurs cependant, ils agiraient par l'intermédiaire des germes hébergés par l'hôte, particulièrement ceux du tube digestif. Ainsi, une expérience de RADISSON et BARTLEY (46 bis) met en évidence la réduction

du pouvoir pathogène des germes du tractus digestif. Ce fait est imputé à une réduction de l'activité métabolique et à l'atténuation de la virulence des souches antibio-résistantes. Ainsi, les faibles doses d'antibiotiques n'éliminent pas les germes pathogènes mais diminuent leur métabolisme.

En même temps que la diminution du métabolisme des germes s'accomplit une modification de la flore intestinale. De nombreux travaux ont été effectués à ce sujet : citons ceux de FERRANDO, SALIN et JOUBERT (46 bis) chez le Pôrc et le Poulet, et ceux de CHANCE et SMITH (46 bis) chez le Veau ; et si les résultats ne sont pas toujours concordants, la plupart des expérimentateurs s'accordent à noter des variations dans le nombre de coliformes et de lactobacilles en particulier. Les antibiotiques modifient l'équilibre des populations microbiennes en favorisant la prédominance d'un groupe de microbes et en permettant la sélection de certains mutants dans une souche donnée, ils changent ses aptitudes physiologiques.

Conclusions.

Lorsqu'un animal est soumis à une alimentation additionnée d'antibiotiques, les germes qu'il héberge constituent un matériel très particulier pour les tests de sensibilité.

— A quel degré l'interprétation des tests se trouve-t-elle modifiée ?

— L'antibio-supplémentation affecte-t-elle exclusivement les germes du tractus intestinal ?

— Les germes situés au niveau des émonctoires sont-ils modifiés ?

Autant de questions qui sont sans réponse et condamnent le vétérinaire praticien à beaucoup de circonspection dans l'utilisation des résultats d'un antibiogramme réalisé avec un tel matériel.

II. — UTILISATION DES RESULTATS DE L'ANTIBIOGRAMME L'ANTIBIOTHERAPIE

Il nous semble utile de mentionner ici que l'antibiogramme ne fait pas l'unanimité parmi les cliniciens et que certains lui déniaient sa valeur indicative dans certains processus pathologiques. Citons, par exemple, le point de vue de J. CIBERT (19) : « Aux premiers temps de l'antibiothérapie, nous avons fondé de grands espoirs pour nous diriger sur les antibiogrammes ; or, ces épreuves destinées à nous indiquer les antibiotiques actifs et ceux auxquels le malade était devenu résistant se sont révélées décevantes ». Certes, ce point de vue est affirmé à l'occasion d'un cas particulier : affections urinaires avec intervention du Bacille de Koch, mais il nous permet d'insister sur le grand nombre de facteurs dont dépend le succès d'une thérapeutique antibiotique.

La considération de l'antibiogramme est primordiale en ce qui concerne les facteurs propres au germe (sensibilité en particulier), mais, comme le signale le Professeur COTTEREAU (21), « si, dans le développement d'une infection, l'action de l'agent infectieux est souvent bien connue, plus fragile est notre connaissance des mécanismes qui président au degré de résistance de l'organisme à l'agression microbienne ». Or, l'agression microbienne se manifeste de diverses façons, d'où les particularités de l'antibiothérapie (82).

A) Antibiothérapie et maladies aiguës.

Les maladies aiguës sont des affections qui se caractérisent par une évolution soudaine, rapide et souvent spectaculaire (hyperthermie brutale et importante, cortège fébrile, tétrade de LEWIS dans les formes localisées).

1) *Dans les formes septicémiques*, on peut estimer que la maladie est due à une véritable pullulation des germes qui présentent une énorme capacité de multiplication et une intense activité métabolique : on considère que ces germes possèdent alors une sensibilité maximale aux agents dirigés contre eux ; leur intense multiplication permet, à partir de quelques souches, la manifestation rapide de toute une population résistante.

Dans ces formes, après avoir choisi l'antibiotique conformément aux résultats de l'antibiogramme, il faut encore que :

— le traitement soit précoce ; il convient d'intervenir à la période hyperthermique (plus grande sensibilité du germe) (12) ;

— il faut choisir parmi les antibiotiques intéressants ceux qui ont la plus forte vitesse de diffusion (3) ;

— le traitement doit comporter une dose d'attaque massive permettant de stopper la pullulation microbienne (94) ;

— les antibiotiques actifs doivent être associés si possible par deux ou par trois, afin de prévenir les risques de sélection de souches résistantes (4, 24, 25) ;

— la durée et le rythme du traitement s'inspireront très étroitement de l'évolution de la courbe de température (76).

Comme nous l'avons déjà signalé, en Médecine vétérinaire il conviendra d'envisager, au moment de l'intervention thérapeutique, l'existence possible d'une flore bactérienne très modifiée par l'antibio-supplémentation. Le Professeur COTTEREAU (21) préconise, dans cette conjoncture, l'association corticoïdes-antibiotiques, la stimulation des réactions de défense de l'organisme pouvant pallier la carence de l'action antibiotique.

2) *Dans les formes localisées*, la multiplication des germes s'effectue au niveau d'un foyer situé dans un tissu particulier ; les germes sont doués également d'un métabolisme très actif et leur sensibilité est maximale.

Dans ce cas, il faut tenir compte essentiellement de la possibilité de diffusion de l'antibiotique au niveau du foyer, car nous avons déjà signalé que les taux de concentration d'un antibiotique dans le sang ne donnent pas à eux seuls une mesure exacte de son activité et qu'il importe de prendre en considération les concentrations tissulaires pour traiter utilement une infection profondément située dans les tissus (64, 65).

Dans une infection expérimentale localisée, A.-C. MANIAR et L. EIDUS (65) ont pu montrer que, parmi les antibiotiques reconnus actifs contre l'agent pathogène par l'antibiogramme, ce sont ceux qui ont l'affinité tissulaire la plus élevée qui protègent le mieux.

— Le choix de l'antibiotique dépend également de sa solubilité et de sa tolérance vis-à-vis du tissu considéré.

— Il faut tenir compte des caractères du tissu infecté et particulièrement de son irrigation, de sa capacité de réaction (on connaît l'intérêt de la vasodilatation locale satellite des phénomènes infectieux dans la pénétration du médicament au sein du foyer). Ces considérations permettent de choisir une voie d'introduction *adéquat* et de préférer parfois la voie locale à la voie générale (arthrites, mammites...) (66).

— Le Professeur COTTEREAU (21) rappelle qu'en Médecine vétérinaire les maladies infectieuses aiguës peuvent subir les bienfaits d'une thérapeutique associant corticoïdes et antibiotiques.

C'est le cas :

— dans les infections de l'œil (blépharite, conjonctivite, kératite et particulièrement kératite interstitielle bleue de la Maladie de Carré du Chien). Ici, c'est l'action anti-inflammatoire des corticoïdes qui est recherchée et qui permet un meilleur contrôle de l'infection par les antibiotiques (LESCURE) (40).

— dans les otites, où le processus inflammatoire anarchique est un élément défavorable qu'il convient de maîtriser (34).

— dans les arthrites, où l'association permet d'éviter les modifications structurales du tissu osseux et la dissémination des agents infectieux (GORET, PARAF, BRION et FONTAINE) (40).

— dans les mammites, où l'obstacle à la pénétration de l'antibiotique au niveau du foyer peut être créé par des grumeaux et produits d'inflammation aiguë qui seront atténués par une indication décongestionnante du pis (affusion chaude), des traites fréquentes, une adjonction de substances anti-inflammatoires aux antibiotiques actifs (21,34).

B) Antibiothérapie et maladies chroniques.

Dans ces formes, l'agent pathogène la plupart du temps est doué d'une activité métabolique atténuée et l'on admet que sa sensibilité aux agents chimiothérapiques est diminuée. Le contact antibiotique-germe doit être assuré pendant un temps assez long. L'utilisation, par exemple de la Sulfaméthoxypyridazine en Médecine vétérinaire, devra comporter, en dehors de la dose de charge, des doses d'entretien pendant 2 à 3 jours dans un cas aigu et *pendant 3 à 8 jours* dans un cas chronique (63).

-- Les affections chroniques peuvent s'accompagner de processus de sclérose ou de prolifération des cellules des endothéliums canaliculaires ; c'est le cas dans les mammites chroniques. Il est primordial, ici, de faciliter la pénétration des antibiotiques à travers ces néoformations tissulaires ; l'adjonction aux antibiotiques de corticoïdes ou de substances fibrinolytiques sera intéressante (34, 64, 85 bis).

— On peut signaler encore un cas où il arrive que l'antibiotique soit celui qui convient, qu'il soit donné selon les règles et qu'il reste sans résultats : il en est ainsi dans les suppurations collectées. Autour de ces suppurations, une coque fibreuse se forme, une barrière vasculaire empêche la pénétration de l'antibiotique à l'intérieur de l'abcès (ROUVILLOIS et VANDECASTEELE) (76). L'antibiothérapie ici n'a pour effet que d'atténuer la réaction périfocale et le seul traitement efficace sera l'évacuation chirurgicale.

— Il est enfin des cas où l'antibiotique indiqué est prescrit, mais une condition locale existe qui favorise l'infection ; on peut obtenir une sédation de la fièvre mais la récurrence survient souvent. C'est le cas des infections que PÉQUINOT (76) appelle les « canaliculites » ou infections d'organes obstrués ; il en est deux principales : les infections des voies urinaires et celles des voies biliaires. Dans ces cas d'infection accompagnée de lithiase du cholédoque ou de lithiase rénale, la solution reviendra finalement au chirurgien (23, 51).

III. — DISCUSSION

Il serait vain d'allonger cette liste qui ne se propose que de montrer la complexité du processus infectieux et la difficulté que peut avoir le clinicien à déterminer la cause exacte d'un échec thérapeutique.

Les renseignements apportés par l'antibiogramme ne concernent qu'un élément du processus infectieux : l'agent pathogène figuré. Sous prétexte de sa relativité, doit-on condamner l'antibiogramme ? Par quel élément du diagnostic pourrait-il être remplacé ? Cet abandon n'aurait pour effet que de rendre aveugle et empirique l'emploi des antibiotiques.

La technique de l'antibiogramme, comme toute technique biologique, n'est pas absolue ; le clinicien doit avoir présentes à l'esprit ses limites ; mais actuellement, elle reste indispensable dans la conduite d'une antibiothérapie (84). Par ailleurs, beaucoup de ses inconvénients seraient éliminés s'il existait une coordination plus étroite entre les actes du clinicien et ceux de l'homme de laboratoire.

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES : ETUDE D'UNE METHODE RAPIDE DE DETERMINATION DE L'ANTIBIOGRAMME

CHAPITRE PREMIER

LE « DADE-STAT TRAY »

Le délai que l'on doit accorder au laboratoire pour l'établissement d'un antibiogramme classique est de 36 à 48 heures. Il est évident que le clinicien désire que ce délai soit le plus court possible, d'où l'intérêt des méthodes « rapides » ou « accélérées ».

SAURAT et LAUTIE (85 bis) soulignent également que la généralisation des antibiogrammes en Médecine vétérinaire est freinée par des raisons économiques, d'où l'intérêt des méthodes simples et peu onéreuses.

Nous nous sommes proposé l'étude du « DADE-STAT » parce que ce test paraissait présenter ce double intérêt (57).

I. — DESCRIPTION

Il s'agit d'une méthode de détermination de l'antibiogramme mise au point et étudiée aux Etats-Unis par BROWN, BECK, WOODWARD et PORTER (8), qui est fondée sur la réduction d'un colorant. Les auteurs lui ont donné le nom de DADE-STAT (DADE-Susceptibility To Antibacterial Testing) et M. G. TROUYEZ (89) l'a expérimentée en France.

A) Principe.

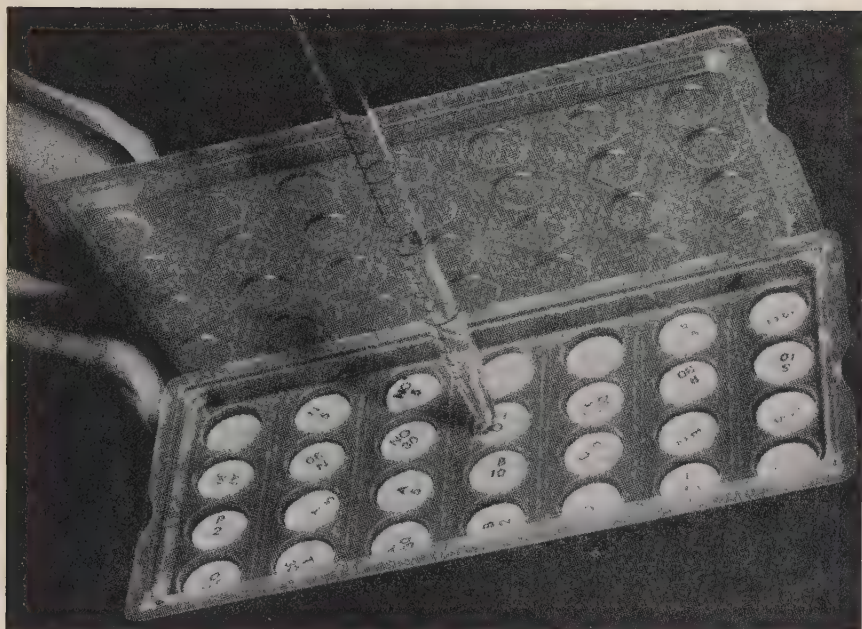
Nous savons que le test de diffusion classique est fondé sur des modifications de la croissance visible des colonies. La croissance des colonies étant, en fait, le résultat plus ou moins fidèle de l'activité métabolique de la culture, certains auteurs ont essayé d'évaluer directement cette activité métabolique en mettant en évidence, dans le milieu, l'accumulation de certains produits. C'est sur ce principe qu'a été mis au point le DADE-STAT (86, 96).

Le chlorure de Triphényltétrazolium (T.T.C. : 2, 3, 5-Triphényl Tétrazolium Chloride) utilisé dans le DADE-STAT en tant qu'indicateur coloré est d'un usage courant aux U.S.A. pour mettre en évidence la production d'acide par une culture microbienne : le T.T.C. virant au rose lors de sa réduction en Triphénylformazan (44, 55, 56, 81 et 101).

B) Matériel.

Des disques de papier filtre sont imprégnés d'une solution comprenant les éléments suivants (86) :

- un milieu de culture à base d'extraits de cœur et d'encéphale, de lactate, de sodium et de glucose. Le poids sec du milieu représente 7,7 mg par disque ;



- un indicateur d'oxydo-réduction qui est le chlorure de Triphényltétrazolium, dont le poids sec est de 0,075 mg par disque ;
- un antibiotique à une concentration déterminée pour chaque disque.

Les disques de papier filtre, après avoir subi certains traitements de dessiccation, sont disposés dans un étui en matière plastique comportant 28 dépressions sur son élément inférieur ; chaque dépression cylindrique correspond à l'emplacement d'un disque de papier. L'élément supérieur de l'étui s'emboîte dans l'élément inférieur à la manière d'un couvercle et assure l'étanchéité de l'ensemble.

Cet étui est lui-même enfermé dans une enveloppe constituée par un complexe Aluminium-Polythènes imperméable à l'humidité.

Notons que chaque antibiotique figure sur les disques à une concentration forte et à une concentration faible qui sont celles recommandées pour les disques habituels par la section des antibiotiques de la « Food and Drug Administration ».

Nous indiquons ci-dessous la liste des antibiotiques, avec leurs concentrations, dont on dispose dans le DADE-STAT.

Antibiotiques	Concentration faible	Concentration forte
Furazolidone	—	50 μg
Chlortétracycline	5 μg	30 μg
Bacitracine	2 Unités	10 Unités
Chloramphénicol	5 μg	30 μg
Erythromycine	2 μg	15 μg
Kanamycine	5 μg	30 μg
Néomycine	5 μg	30 μg
Novobiocine	5 μg	30 μg
Oléandomycine	2 μg	15 μg
Pénicilline	2 Unités	10 Unités
Polymyxine	50 μg	300 μg
Ristocetine	5 μg	30 μg
Streptomycine	2 μg	10 μg
Tétracycline	5 μg	30 μg

II. — UTILISATION

A) Réalisation.

Lors de l'utilisation du test, on déchire simplement l'enveloppe d'aluminium et on travaille avec l'étui en plastique selon les principes bactériologiques habituels d'asepsie et en particulier devant la flamme d'un bec Bunsen.

Tous les disques sont imprégnés par 2 ou 3 gouttes d'un bouillon de culture à l'aide d'une pipette pour sérologie de 5 ou 10 ml. On replace immédiatement le couvercle de l'étui afin d'éviter une trop forte évaporation. L'étui est alors remis dans son enveloppe et porté à l'étuve à 37° C.

La période d'incubation est considérée comme terminée lorsque le disque de contrôle présente une teinte rosé franc, témoin d'une croissance bactérienne suffisante, ce qui nécessite en général de 3 à 5 heures.

Notons que dans cette méthode le test n'est réellement valable que si l'on travaille en culture pure ; tout comme dans la méthode de diffusion en gélose, il faut d'abord effectuer un isolement bactérien. De même, l'importance du nombre de germes dans l'inoculum intervient : si la culture est trop pauvre, le virage de l'indicateur sera tardif ; si la culture est trop riche, le colorant risque d'être réduit avant que l'antibiotique ait pu agir. Les conditions optimales sont réunies par une culture jeune, commençant juste à troubler le milieu (5, 8).

Enfin, le Chlorure de Triphényl Tétrazolium étant photosensible il faut éviter d'exposer le matériel à une lumière trop forte (8, 89).

B) Interprétation des résultats.

Elle est simple. On notera :

— *Germes résistants* : les deux disques de faible et forte concentrations d'un même antibiotique présentent une coloration rose d'intensité égale ou supérieure à celle du disque de contrôle ;

— *Germes sensibles* : les deux disques ne présentent pas de coloration ou une coloration plus faible que celle du disque de contrôle ;

— *Germes modérément sensibles* : la coloration du disque à forte concentration est nulle ou inférieure à celle du disque de contrôle ; celle du disque faible est identique ou supérieure.

CHAPITRE II

INTERET DU « DADE-STAT TRAY »

COMPARAISON AVEC LES METHODES CLASSIQUES

A. — AVANTAGES

Cette méthode satisfait aux principes que nous avons définis dans la première partie et qui permettent de porter un jugement de valeur sur un antibiogramme.

1° Facilité de réalisation et rapidité.

— C'est une méthode pratique ; les manipulations sont réduites, ce qui diminue les risques de pollution et d'erreurs techniques propres au manipulateur.

— Les différents stades opératoires sont simples et permettent la réalisation du test par un personnel ayant une qualification relativement élémentaire et rapidement acquise.

— Le gain de temps. C'est la raison d'être de ce test : si l'on considère le temps écoulé entre le moment de l'ensemencement et le moment de la lecture des résultats, la méthode apparaît rapide puisque BROWN et coll (8) affir-

ment que 85 % des résultats peuvent être lus en 3 heures après le début de l'incubation, en particulier pour les germes Gram négatif. Ce gain de temps est obtenu par la conjonction de deux phénomènes :

- suppression du temps de latence existant dans la méthode de diffusion en gélose ;
- richesse du milieu de culture qui, associée avec une température et un degré hygrométrique convenables, place la culture dans les conditions optimales de développement.

Rappelons que, dans la méthode classique de diffusion en gélose, on utilisait un milieu de culture relativement pauvre pour compenser, par un développement lent de la culture, le temps de latence lié à la diffusion de l'antibiotique.

2° Concordance des résultats *in vitro* et *in vivo*.

La technique de diffusion en gélose pour laquelle la concordance des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* a été vérifiée peut servir d'élément de référence.

BIÉRINGER et MIALE (5) ont comparé les résultats obtenus avec les méthodes pour 1.150 cultures provenant de 801 organismes différents. Nous rassemblons ces résultats dans le tableau ci-dessous.

Origine	Nombre de tests	Concordance %	Discordance %	Résultats douteux %
Appareil uro-génital	410	96,2	2,5	1,3
Appareil respiratoire	287	95,4	3,3	1,3
Abcès	380	95,3	2,8	1,9
Fèces	40	97,4	2,6	0
Sang	33	96,4	2,7	0,9

Les mêmes auteurs ont également étudié les résultats obtenus avec un mélange de germes. Leurs études portent sur 148 prélèvements et sont rapportées dans le tableau ci-dessous.

Origine	Nombre de tests	Concordance %	Discordance %	Résultats douteux %
Prélèvements d'urine	75	91,6	2,2	6,2
Culot de centrifugation d'urine	39	95,8	2,9	1,3
Prélèvements au niveau d'abcès, furoncles, rhino-pharynx, etc.	34	92,1	3,3	4,6

BROWN et coll. (8) ont fait des études de concordance portant sur 746 cultures comprenant *Aérobacter*, *Alcaligènes*, *Diplococcus*, *Eschérichia*, *Hérella*, *Paracolibactrum*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*. La méthode de référence utilisée est toujours la méthode de diffusion sur gélose.

Ils ont rassemblé leurs résultats en fonction des antibiotiques.

Antibiotique	Concordance %
Streptomycine	83
Kanamycine	85
Néomycine	86
Auréomycine	88
Altafur	95
Novobiocine	99
Bacitracine	99
Erythromycine	99
Chloramphénicol	100
Polymyxine	100
Ristocétine	100
Pénicilline	100
Oléandomycine	100

Nous avons expérimenté la méthode au laboratoire de Bactériologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. Les germes étudiés provenaient soit de souches de collections, soit de prélèvements effectués sur les animaux hospitalisés dans les cliniques. Nous avons toujours utilisé comme élément de référence la technique classique des disques.

Nous donnerons, à titre d'exemple, les détails de deux de ces expérimentations ayant porté sur la flore intestinale de porcs atteints de pancréatite aiguë nécrosante (49) ; puis nous rassemblerons dans un tableau l'ensemble des résultats que nous avons pu recueillir soit à l'Ecole Vétérinaire, soit dans les laboratoires ayant utilisé la méthode.

1) DÉTAIL DE L'EXPÉRIMENTATION ayant porté sur la flore bactérienne de porcs : les germes ont été isolés à partir des fèces de porcs provenant de deux lots différents.

Du LOT « 6205 », dont les porcs présentaient une diarrhée « mayonnaise » ont été isolés : 1 *Escherichia coli* (6205 A), 1 *Arizona* (6205 B), 1 *Klebsiella* (6205 C).

Du LOT « 6206 », dont les porcs présentaient une diarrhée rouge, ont été isolés : 1 *Proteus* (6206, 1 A), 3 *Escherichia coli* (6206, 1 B, 2, 3 A), *Klebsiella* (6206, 3 B), 1 *Hofnia* (6206, 4 B), 1 *Staphylococcus aureus*.

MÉTHODE DES DISQUES.

6205	Pe	Ux	St	Cl	Au	Te	Er	Ma	Sp	Fr	Ne
5 A	—	30	—	45	—	—	—	—	—	+	+
5 B	—	—	20	40	—	—	—	—	—	+	+
5 C	—	—	20	40	—	—	—	—	—	+	+

N.-B. (—) : aucune inhibition.

« DAE-STAT ».

6205	Oléando- mycine		Chloram- phénicol		Novo- biocine		Péni- cilline		Néo- mycine		Poly- mycine		Kana- mycine		Risto- cétine		Erythro- mycine		Strepto- mycine		Terra- mycine
	2	15 30	5	30 5	10 2	30 5	300 50	30 5	50 30	50 30	50 30	50 30	50 30	50 30	50 30	15 2	10 2	10 2	10 2		
5 A	—	++	—	++	++	—	+	++	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	5	
5 B	—	+	—	—	—	—	+	++	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	+	
5 C	—	—	+	++	++	+	++	++	+	++	++	++	++	++	—	+	+	+	—	+	

N.-B. (—) : antibiotique actif : pas de coloration.

+ : coloration inférieure ou égale à celle du disque de contrôle.

++ : coloration supérieure à celle du disque de contrôle.

MÉTHODE DES DISQUES.

[illegible]

« DADE-STAT ».

6206	Oléando- mycine		Chloram- phenicol		Novo- biocine		Péni- cilline		Néo- mycine		Poly- myxine		Kana- mycine		Risto- cétine		Erythro- mycine		Strepto- mycine		Terra- mycine	
	2	15	30	5	30	5	10	2	30	5	30	50	30	5	30	5	15	2	10	2	5	
Staph. 1 A 2 3 B 4 A 4 B	—	—	—	—	++	+	—	—	—	—	++	++	—	—	—	—	—	—	+	+	+	
	—	—	+	—	—	—	+	—	+	+	++	++	—	—	—	—	+	+	+	—	—	
	—	—	—	—	—	—	?	?	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	
	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	

2) Tableau récapitulatif des résultats obtenus au laboratoire

Germe	Nombre de tests	Résultats	
		concordants	douteux
Proteus	25	23	2
Escherichia coli et divers entérobact.	18	16	1
Staphylococcus	12	11	1
Pseudomonas	7	7	—
Diplococcus	10	5	4
Streptococcus	10	5	3

2) Tableau récapitulatif des résultats obtenus au laboratoire (voir ci-contre)

En considérant ces différents tableaux, de résultats, on constate que le coefficient de corrélation est satisfaisant, particulièrement pour les germes Gram négatif. Cependant, pour les germes Gram positif, nous avons eu personnellement (sauf pour le *Pseudomonas*) quelques difficultés à obtenir des résultats utilisables.

3° Possibilités de standardisation.

Le « DADE-STAT » supprime la cause de variation constituée par la diffusion de l'antibiotique. Nous savons que les lois de la diffusion dans la gélose sont complexes et font intervenir la nature de l'antibiotique, la composition du milieu de culture, son épaisseur, etc...

La notion de phase de croissance n'est plus à considérer puisqu'elle était liée au temps de latence dans les méthodes de diffusion. C'est donc une condition en moins à imposer à l'inoculum.

La composition du milieu de culture, constante et indépendante de l'opérateur, n'est plus la source de variations dans les résultats.

Le pH de chacun des milieux est calculé de façon que chaque antibiotique soit à son pH optimum. C'est une importante source de variations qui est ainsi supprimée.

Rappelons que, dans les techniques classiques, les antibiotiques ne pouvaient être tous ensemble à leur pH optimum ; il faut cependant noter que les pH optima « *in vitro* » ne sont pas toujours les pH existant « *in vivo* ».

Le « DADE-STAT » présente donc l'énorme avantage de permettre l'obtention de résultats plus uniformes grâce à une standardisation très étroite.

B. — INCONVENIENTS

Le DADE-STAT présente divers inconvénients.

1° D'un point de vue dogmatique.

Ce test ne correspond pas aux recommandations formulées par les experts de l'O.M.S. (72) dans un rapport sur la standardisation de la méthodologie des tests de sensibilité bactérienne ; ils estiment que la technique des disques répond aux besoins cliniques en général.

2° D'un point de vue pratique.

Germes ayant un métabolisme insuffisant.

Le virage du T.T.C. est lié au pouvoir oxydo-réducteur de la culture, donc au métabolisme des bactéries et il faut distinguer la culture bactérienne de son activité métabolique.

Personnellement, nous avons eu quelques résultats aberrants ou imprécis avec des bactéries Gram +, tout particulièrement avec des souches de *Streptococcus* β hémolyticus. Avec de tels germes, le délai de lecture est toujours augmenté (6 heures environ) et parfois la lecture est impossible car ni les milieux imprégnés d'antibiotique ni le milieu de contrôle ne virent au rose. D'autres expérimentateurs ayant utilisé la méthode ont eu également quelques difficultés avec les Gram +.

Ces échecs ou ces imprécisions sont imputables, à notre avis, à un métabolisme insuffisant des germes considérés, or l'on sait qu'en général les germes Gram + ont un métabolisme moins actif que les germes Gram —.

Un aménagement de la technique a été proposé pour pallier cet inconvénient. Il repose sur la constatation selon laquelle la plupart des germes positifs réduisent mieux l'indicateur dans une atmosphère appauvrie en oxygène. Si au bout de 5 heures d'incubation aucun milieu et en particulier le milieu de contrôle ne présente de coloration, nous plaçons l'étui dans une jarre pour anaérobies et prolongeons l'incubation. Dans ces conditions, la plus grande partie des souches deviennent capables de réduire le T.T.C. et cet aménagement nous a donné satisfaction. Il n'en reste pas moins que, pour certaines souches de Streptocoques et de Staphylocoques, il est nécessaire de revenir à une méthode classique.

Manque de généralité de la méthode « DADE-STAT ».

Nous n'avons jamais mentionné, dans nos résultats, les germes anaérobies, bien que nous ayons essayé de les tester par cette méthode. L'anaérobiose est facile à réaliser en plaçant dans l'étui une substance anti-oxygène et en enroulant un ruban adhésif sur les bords de l'étui.

Avec les germes anaérobies, la lecture des résultats est toujours délicate, car la croissance de la culture s'accompagne de phénomènes lytiques et de dégagements gazeux qui bouleversent considérablement le milieu de culture et rendent l'interprétation d'un changement de teinte aléatoire.

Bien plus, lorsque exceptionnellement les résultats sont lisibles, ils n'ont aucune valeur, ne concordant que rarement avec les résultats obtenus avec les méthodes de référence.

Nous pensons que le DADE-STAT est inutilisable pour les germes anaérobies. Ce fait laisse supposer d'ailleurs des différences fondamentales entre le métabolisme des germes aérobie et anaérobies.

Le bacille de Koch ne peut être testé par cette méthode. Nous tenons à le mentionner, bien que le contraire eût été étonnant car on connaît les exigences très particulières du bacille de Koch.

Un inconvénient plus important du DADE-STAT est l'absence des sulfamides dans la gamme des agents chimio-thérapeutiques étudiés. En Médecine vétérinaire, les sulfamides, peu onéreux et qui ont un spectre d'activité étendu, restent un élément essentiel de la thérapeutique.

Lecture fastidieuse de certains résultats.

Il est important, dans cette méthode, de lire l'ensemble des résultats dès le virage du milieu témoin. Le manipulateur doit donc repérer, avec suffisamment de précision, le moment de ce premier virage. Dans 80 % des cas, il suffira de surveiller la culture pendant un temps assez court à partir de la deuxième heure d'incubation. Mais dans les autres cas, la surveillance peut se prolonger jusqu'au-delà de la cinquième heure et comporter même parfois de nouvelles manipulations (jarre à anaérobiose...). Cette méthode apparaît moins pratique que la méthode classique où, après mise à l'étuve, on ne se préoccupe de la boîte de Pétri que douze heures après.

Gain de temps sujet à caution.

Affirmer que les résultats du test sont fournis dans un délai de trois heures, c'est ne pas tenir compte de la nécessité de travailler avec des cultures isolées. Dans les délais, il faut donc inclure le temps préliminaire de l'isolement puisque, généralement, le clinicien envoie un prélèvement polymicrobien. Il convient d'inclure aussi le temps du repiquage en bouillon de culture permettant de prélever l'inoculum au moment où la culture commence à troubler le milieu. Un délai de 24 heures correspond mieux à la réalité.

Le gain de temps existe par rapport à la méthode classique, mais il n'est plus dans le rapport de 5 à 36 mais de 24 à 36.

II. — COMPARAISON AVEC D'AUTRES METHODES ACCELEREES

Les méthodes accélérées sont très nombreuses ; nous en donnerons quelques exemples.

1° Méthodes fondées sur un principe différent du DADE-STAT.

— La méthode de L.-A. RANTZ et H.-H. RANTZ (81 bis) en milieu solide : L'antibiotique est incorporé dans un milieu solide et on n'utilise qu'une seule concentration de chaque antibiotique. Les germes sont considérés comme résistants ou sensibles selon qu'ils forment ou non des colonies lorsqu'ils sont ensemencés sur de tels milieux.

Les auteurs ont utilisé avec succès la méthode pour 4 antibiotiques :

Pénicilline : 0,4 U/ml ; Streptomycine, Terramycine, Chloramphénicol : 10 γ /ml.

Cette méthode n'est pas générale (quatre antibiotiques seulement) et le gain de temps n'est constitué que par un allègement des manipulations. Elle n'est intéressante que pour l'étude de souches de collection et l'établissement de statistiques.

— La méthode de L.-H. SCHWARZ, B.-A. BROWN (86 bis) en milieu liquide. C'est une variante de la méthode des dilutions utilisant des milieux liquides. Le gain de temps et l'originalité de la méthode résident dans le fait que les

tubes sont préparés à l'avance et contiennent un antibiotique et un milieu lyophilisé. On ajoute 1 ml d'une culture de 18 à 24 heures contenant le germe à tester.

Les corrélations avec les méthodes de référence n'ont pas été étudiées avec précision et le gain de temps est faible.

2° Méthodes utilisant le pouvoir oxydo-réducteur de la culture.

Elles sont très nombreuses et utilisent des indicateurs variés.

DUPAIX-LASSEUR (30) proposa, en 1964, une technique utilisant comme indicateur redox le 2,6 dichlorophénol-indophénol. Lors de la réalisation du test, le manipulateur doit mélanger la suspension microbienne, la solution d'antibiotique et le milieu : les manipulations restent très importantes et délicates.

Cet exemple ne prétend pas épuiser le sujet, mais indique que l'originalité du DADE-STAT ne réside pas dans son principe mais dans sa présentation et son protocole d'utilisation.

3° Méthode originale dérivée de la méthode des disques.

Beaucoup plus intéressante est la méthode préconisée par Y.-A. CHABERT (14) sous le nom d'antibiogramme multiple. Considérant que la longueur des délais, dans la méthode classique de diffusion en gélose, est due à la succession de deux temps : l'isolement et le test lui-même, Y.-A. CHABERT obtient un gain de temps en appliquant avec quelques aménagements la méthode de diffusion à une culture primaire.

On sait que l'inconvénient majeur des antibiogrammes globaux est de ne déterminer la sensibilité que de la souche la plus résistante, qu'elle soit saprophyte ou pathogène.

Pour travailler avec un inoculum optimum pour chaque élément de la population microbienne, l'auteur propose d'ensemencer plusieurs milieux gélosés avec diverses dilutions du matériel initial.

a) Le produit est examiné au microscope.

— s'il contient une flore peu abondante, on le dilue au 1/2 et au 1/10 ;

— s'il présente une flore moyenne, on fait 3 dilutions : 1/10, 1/100 et 1/1000 ;

— si la flore a la densité d'une culture en milieu liquide, on dilue au 1/100 et au 1/1000.

Dans le choix des dilutions, d'autres facteurs interviennent : la facilité de croissance des bactéries observées, la taille habituelle de leurs colonies...

La détermination des dilutions *ad hoc* est laissée à l'appréciation du technicien qui fait la synthèse des différentes caractéristiques du produit initial. Cette méthode est réservée à des manipulateurs sûrs de leur art.

b) Après culture, l'espèce la plus représentée donne en général des colonies de densité convenable sur la boîte ensemencée avec la plus forte dilution, et la lecture de leur antibiogramme peut s'effectuer dès ce stade. Pour les espèces les moins représentées, elles apparaissent en colonies plus ou moins confondues avec d'autres et doivent être repiquées pour être testées avec précision.

Cette technique permet un gain de temps d'une douzaine d'heures et elle présente l'avantage d'être générale et d'appliquer les principes bactériologiques pastoriens.

4° Technique accélérée proposée par le Comité d'Experts des Antibiotiques de l'O. M. S.

Cette technique consiste à appliquer la méthode de diffusion à une culture primaire sur gélose. On réalise un isolement normal sur une boîte de Pétri par épuisement de la semence. Les conditions suivantes doivent être observées :

a) Les disques sont placés sur la moitié de la boîte où les colonies sont habituellement séparées. Sur l'autre moitié dépourvue de disques s'effectue une croissance normale permettant l'identification de tous les germes présents.

b) Il doit y avoir un nombre suffisant de colonies pour que l'on puisse délimiter avec précision la zone d'inhibition.

c) Lorsqu'on a affaire à des cultures mixtes, il est important de s'assurer qu'à l'exception de l'espèce pathogène dont la sensibilité doit être déterminée, il n'existe aucun germe capable de détruire l'un ou l'autre des antibiotiques testés. Cette interférence ne se produit pratiquement qu'avec des germes producteurs de pénicilline : si le seul organisme infectant est, par exemple, un Staphylocoque, le résultat du test sera valable, mais s'il y a également un Streptocoque, on pourra croire à la résistance à la Pénicilline alors qu'en réalité il n'en sera rien.

Les résultats peuvent être lus au bout de 6 à 8 heures.

Les promoteurs de ce test concluent : « les résultats d'un test de ce genre ne doivent pas être trop formels et il faut, si possible, les vérifier par un test sur culture pure ».

D'une réalisation peut-être plus simple que le test précédent, cette technique paraît toutefois moins précise.

III. — CONCLUSIONS RELATIVES A L'ETUDE DU DADE-STAT

1° Par rapport aux tests classiques, cette méthode permet un gain de temps indéniable et présente l'énorme avantage d'être étroitement standardisée.

2° Par rapport aux méthodes rapides, si l'on excepte l'antibiogramme multiple de CHABERT et la technique proposée par l'O.M.S., le DADE-STAT apparaît plus simple, plus pratique et, tout compte fait, plus précis.

3° Par rapport aux méthodes proposées par Y.-A. CHABBERT et les experts de l'O.M.S., le DADE-STAT est moins délicat, moins onéreux, mieux standardisé, mais il a l'inconvénient d'être moins fidèle, moins précis et d'un principe moins rigoureux.

4° En Médecine humaine, il semble que l'on ne puisse retenir actuellement, en tant que technique accélérée, que l'« antibiogramme multiple » et le test proposé par les experts de l'O.M.S. (72).

En bactériologie vétérinaire, compte tenu des impératifs particuliers à celle-ci, le DADE-STAT peut rendre des services ; mais il conviendrait qu'il fasse l'objet d'une étude plus complète, particulièrement en ce qui concerne les germes Gram + et qu'un milieu contenant des sulfamides soit adjoint.

CONCLUSIONS GENERALES

De cette étude, nous pouvons conclure que :

— L'usage des antibiogrammes repose sur le principe, vérifié expérimentalement, qu'il n'y a pas de différence de nature entre l'action *in vivo* et *in vitro* des antibiotiques.

— L'antibiogramme n'est qu'un sondage à l'intérieur de phénomènes complexes, rendu nécessaire par la menace de l'antibiorésistance des bactéries.

— Toutes les techniques n'ont pas la même valeur, et il existe un certain nombre de critères d'appréciation.

— En Bactériologie vétérinaire, la méthode des disques est la plus couramment employée ; cependant, la technique des dilutions doit rester l'élément de référence.

— Les techniques concernant les germes anaérobies et l'activité des sulfamides n'ont encore actuellement qu'une valeur qualitative.

— La Bactériologie vétérinaire réclame des techniques accélérées et peu onéreuses ; à cet égard, le DADE-STAT possède un intérêt indéniable, mais n'a pas la rigueur des techniques classiques.

VU : le Directeur
de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Lyon,

FLORIO

Le Professeur responsable
de l'Ecole Nationale
Vétérinaire,

JOUBERT

Vu :
Le Doyen,
J.-F. CIER

Le Président de la thèse,
MONNET

Vu et permis d'imprimer
Lyon, le 29 avril 1965

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université
P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

1. ABRAHAM (E.-P.) et NEWTON (G.-G.). — Chemistry and classification of antibiotics. *Brit. Med. Bull.*, 1960, 1, 3-10.
2. BACQ (Z.-M.), CHEYMOL (J.), DALLEMAGNE (M.-J.), HAZARD (R.), LA BARRE (J.), REUSS (J.-J.), WELSCH (M.). — Pharmacodynamie biochimique. 2^e éd., Masson et Cie, éd., Paris, 1961, 477-587.
- 2 ^{bis} BEERENS (H.), GUILLAUME (J.). — Technique de détermination de la sensibilité des bactéries anaérobies aux antibiotiques par la méthode des disques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, 86, 781-785.
3. BENHAMOU (Ed.), DESTAING (F.) et SORREL (A.). — Les thérapeutiques antibiotiques des maladies. Masson éd., Paris, 1950.
4. BENHAMOU (Ed.) et SORREL (A.). — L'association des antibiotiques fungiques dans le traitement des maladies infectieuses. *Presse Méd.*, 1951, 59, 1950.
- 4 ^{bis} BERNARD (E.), KREIS (B.), PARIENTE (O.) et PIERON (R.). — Résistance et survivance des bacilles dans les rechutes de la tuberculose pulmonaire. *Presse Médicale* (9 mars 1963).
5. BIERINGER (G.-S.) et MIALE (J.-B.). — Evaluation of a rapid dye-reduction test for bacterial susceptibility to antibiotics. *Am. J. Clin. Path.*, 1961, 36, 192-202.
6. BORY (J.), DESVIGNES (A.) et JUND (Y.). — Mécanisme d'action des médicaments antibactériens. *Prod. et Prob. Pharm.*, 1963, 9, 413-418.

7. BREUGNOT (J.) et THOUVENIN (H.). — Prélèvements et transmission des analyses. Berger-Levrault, éd., Nancy, 1960.
8. BROWN (J.-R.), BECK (R.-W.), WOODWARD (J.-M.) et PORTER (R.-P.). — A rapid test for bacterial sensitivity to antibiotics. *Am. J. Clin. Path.*, 1961, 35, 10-13.
9. BUGARD (P.), HENRY (M.) et JOUBERT (L.). — Maladies de civilisation et dirigisme biologique. Masson éd., Paris, 1962.
10. BUTTIAUX (R.), BEERENS (H.) et TACQUET (A.). — Manuel de techniques bactériologiques. Flammarion éd., Paris, 1962, 376-425.
11. CASSAGNE (H.). — Milieux de culture. Editions de la Tourelle, Saint-Mandé, 1961, Tomes 1 et 2.
12. CAWADIAS. — La fièvre continue d'origine sympathique. *Ann. Méd.*, 1920, 7, 450.
13. CHABBERT (Y.). — Contribution à l'étude du dosage de la Pénicilline en clinique. *Thèse Doct. Méd.*, Bordeaux, 1947.
14. CHABBERT (Y.). — L'Antibiogramme. Editions de la Tourelle, Saint-Mandé, 1963.
15. CHABBERT (Y.). — Titrage de la sensibilité des germes aérobies aux antibiotiques par la méthode des cupules en gélose. *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, 76, 68.
16. CHABBERT (Y.). — Quelques points particuliers à propos de la méthode des disques pour la détermination de la sensibilité microbienne aux antibiotiques. *Ann. Biol. Clin.*, 1951, 9, 544.
17. CHABBERT (Y.). — Notion de « performance » dans la standardisation des disques pour antibiogramme. *Progr. Immunobiol. Standard*, 1, 35-38.
18. CHABBERT (Y.) et SURREAU (B.). — Microdosage clinique des antibiotiques. Adaptation à une méthode dérivée de la « Slide Cell » de la technique glucose P.S.P. *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, 73, 1.130.

19. CIBERT (J.). — Evolution des méthodes d'exploration et de traitement de la tuberculose urinaire. *Rev. de l'Assoc. Lyonnaise de l'Externat*, 1957, 33, 331.
20. COTTEREAU (Ph.). — Cours magistral de Pathologie du Bétail. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, année scolaire 1963-1964.
21. COTTEREAU (Ph.). — Sur l'intérêt de l'association corticoïdes-antibiotiques en Pathologie animale. *Rev. Pathol. Gén. et Physiol. Clin.*, 1959, 712, 1.135-1.152.
22. COTTEREAU (Ph.), FERNEY (J.), DE SAINT-AUBERT (G.) et OUDAR (J.). — Entérotoxémie des agneaux nouveau-nés ou à la mamelle. *Bull. Acad. Vét.*, 1963, 36, 381-387.
23. COUVELAIRE (R.) et BRIZON (J.). — Tuberculose urinaire et lithiase. *Journ. d'Urol.*, 1956, 62, 83.
24. CUENOT (A.). — L'association des antibiotiques est-elle toujours la solution la meilleure ? *J. Méd. Bordeaux*, 1956, 31, 133.
25. DECOURT (Ph.). — Etudes et documents. Phénomènes de Reilly et syndrome général d'adaptation. *Edit. Hesperis*, 1951.
- 25 ^{bis}. DE LAVERGNE (E.), BURDIN (J.-C.), SCHMITT (J.), LE MOYNE (M.). — Etude du comportement de 17 espèces anaérobies strictes vis-à-vis de 11 antibiotiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 91, 631-639.
26. DOLL (E.-R.) et WALLACE (M.-E.). — Posologie de la streptomycine et concentration dans le sérum chez les chevaux. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1948, 43, 410.
27. DOLL (E.-R.) et WALLACE (M.-E.). — Dosage and blood level of streptomycin in sheep. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1948, 113, 55.
28. DOLL (E.-R.) et WALLACE (M.-E.). — Serum level of streptomycin in sheep. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1949, 44, 70.
29. DUMAS (J.). — Bactériologie médicale. Flammarion éd., Paris, 1951, 621-634.

30. DUPAIX-LASSEUR (A.). — Nouvelle technique accélérée de lecture des antibiogrammes. *Bull. Ass. Dipl. Microb. Nancy*, 1962, 88, 25-26.
31. ECK (A.). — Le lait et l'industrie laitière. P.U.F. éd., Paris, 1962, 17-18.
32. FAGUET (M.) et GOUDOT (A.). — Etude de l'effet antibiotique de la streptomycine en présence d'adénosine 5-tri-phosphate (ATP-K⁺). *Ann. Inst. Pasteur*, 1964, 106, 48-56.
33. FARI (A.) et LAMENSANS (A.). — Action du sulfamide sur la synthèse des protéines bactériennes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, 100, 81-92.
34. FLORIO (R.). — Sur les principales indications de la corticothérapie en Médecine vétérinaire. *Rev. Méd. Vét.*, 1957, 108, 626.
35. FORSTER (J.-W.) et WILKER (B.-L.). — Microbiological aspects of Penicillin. Turbidometric studies on Penicillin inhibition. *J. Bact.*, 1943, 46, 377.
36. FRANÇOIS (A.-C.). — Mode d'action des antibiotiques sur la croissance. *Econ. et Méd. Animales*, 1962, 2, 77.
37. GALE (E.-F.). — The nature of the selective toxicity of antibiotics. *Brit. Med. Bull.*, 1960, 1, 11-15.
38. GODFRAIN (J.-C.) et MILHAUD (G.). — Mécanisme de l'action antimicrobienne des antibiotiques. *Rev. Méd. Vét.*, 1964, 6, 408-423.
39. GORET (P.), JOUBERT (L.) et CLAVEL (P.). — Technique de contrôle rapide d'un traitement par les antibiotiques en Médecine vétérinaire. *Bull. Acad. Vét.*, 1952, 25, 307-330.
40. GORET (P.), PARAF (A.), BRION (A.) et FONTAINE (M.). — Aspects particuliers de l'usage de la cortisone en thérapeutique vétérinaire ; son emploi dans le traitement des affections articulaires des carnivores domestiques. *Rev. du Rhumatisme*, 1956, 12, 1.

41. GORET (P.), JOUBERT (L.) et SAURAT (P.). — Le mécanisme d'action des antibiotiques. *Rev. Path. Comp.*, 1951, 51, 427 et 487.
42. GOUDOT (A.) et FAGUET (M.). — Sur l'inactivation de la Streptomycine par l'ATP K et quelques aspects électroniques de cette action. *C. R. Acad. Sci.*, 1963, 24, 5.220.
43. HEATLEY (N.-G.). — A method for the assay of Penicillin. *Biochim. J.*, 1944, 38, 61.
44. HUDDLESON (I.-F.) et BALTZER (B.). — Differentiation of bacterial species by means of 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride in culture medium. *Science*, 1950, 112, 651-652.
45. JAWETZ (E.) et SPECK (R.-S.). — Joint action of Penicillin with chloramphenicol on an experimental streptococcal infection in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1950, 74, 93.
46. JAWETZ (E.), GUNNISON (J.-B.) et COLEMAN. — The combined action of Penicillin with Streptomycin and Chloromycetin on enterococci in vitro. *Sciences*, 1950, 111, 254.
- 46 bis. JEAN-BLAIN (Cl.). — Les antibiotiques dans l'alimentation des animaux domestiques. *Thèse Doct. Vét.*, Lyon, 1961.
47. JOUBERT (L.). — Cours magistral de Microbiologie. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, année scolaire 1962-1963.
48. JOUBERT (L.). — La néopathologie animale et l'élevage moderne. *Bull. Soc. Vét. Prat. France* (annexe), 1964, 48, 55-78.
49. JOUBERT (L.), MAGAT (A.), VAN HAVERBEKE (G.), OUDAR (J.) et LEFTHERIOTIS (E.). — Pancréatite aiguë nécrosante stéatorrhéique d'allure enzootique chez le Porc d'engrais. *Rev. Méd. Vét.*, 1964, 27 (nouvelle série), 454-490.
50. JOUINOT (G.). — Sur le titrage rapide de l'antibio-sensibilité des germes infectieux par la méthode des cupules en gélose. *Thèse Doct. Vét.*, Lyon, 1951.
51. KNEBELMANN. — Traitement de l'infection urinaire à Colibacilles. *Marseille Médical*, 1955, 92, 393.

52. KNOX (R.). — Contrasting patterns of drug resistance in tubercle bacilli and staphylococci. *Sci. Basis Med.* (Ann. Rev.), 1962, 77-93.
53. KUEMMERLE (H.-P.) et CONTZEN (H.). — Experimentelle Studie zum Verteilungsprobleme der Antibiotika (Tetracyclin derivative) und neuerer Sulfonamide im pathologisch-veränderten Gewebe des Menschen. I. Antibiotika. *Chemotherapie* (Basel), 1962, 4, 535-545.
II. Sulfonamide. *Chemotherapie* (Basel), 1962, 4, 546-558.
54. KUEMMERLE (H.-P.), CONTZEN (H.) et SCHÜLKE (K.). — Experimentelle Studie zum Verteilungsproblem der Antibiotika unter pathologischen Bedingungen beim Menschen mit 7-chloro-6-demethylchlorotetracyclin und Pyrrolidinomethyltetracyclin. *Chemotherapie* (Basel), 1962, 5, 193-199.
55. LAXMINARAYANA (H.) et IYA (K.-K.). — Studies on the reduction of tetrazolium by lactic acid bacteria. I. Dye reducing activities of different species. *Indian J. Dairy Soc.*, 1953, 6, 75-91.
56. LAXMINARAYANA (H.) et IYA (K.-K.). — Tetrazolium as a valuable tool in microbiological work. *Current Sc.*, 1952, 21, 124-125.
57. LIND (H.-E.) et SWANTON (E.-M.). — Routine bacteriologic sensitivity determinations in antibiotic treatment. *Antibiotic and Chemother.*, 1952, 2, 30-34.
58. LOGEMANN (W.), ALMIRANTE (L.), GALIMBERTI (S.) et DE CARNERI (I.). — Influence of dichloroacetylation on the antimicrobial activity of chloramphenicol derivatives and of various amines. *Brit. J. Pharmacol.*, 1961, 17, 286-296.
59. LORIAN (V.). — AntibioGramme rapide pour mélanges d'antibiotiques. *Presse Méd.*, 1962, 70, 1.933-1.934.
60. LONG (P.-H.). — Bacterial resistance as a factor in antibiotic therapy. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1952, 28, 809-816.
61. LOWBURY (E.-J.-L.). — Drug resistance and the response to therapy. *Sci. Basis Med.* (Ann. Rev.). 1962, 57-76.

62. MACHEBŒUF (M.) et GROS (F.). — Recherches biochimiques sur le mode d'action des antibiotiques. *Exp. Ann. Méd.*, 1951, 12, 141-160.
63. MAGNIN-FEYSOT (G.). — La sulfaméthoxypyridazine. Ses applications en Médecine vétérinaire. *Thèse Doct. Vét.*, Alfort, 1960.
64. MALEK (P.) et KOLC (J.). — Pénétration de la chlor-tétracycline dans les tissus pathologiques. *Antibiotics and Chemotherapy*, 1960, 488.
65. MANIAR (A.-C.) et EIDUS (L.). — Un des facteurs influençant l'action des antibiotiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, 6, 887.
66. MASSIAS (P.). — L'antibiothérapie par voie articulaire. *G. M. de France*, 1964, 171, 1.495-1.498.
67. MAYOUX (R.), REBATTU (J.-P.) et CARRAZ. — Etude expérimentale de la résistance des germes aux antibiotiques. *Presse Méd.*, 21 mai 1955, compte rendu de Louis Eicholz.
68. MONNIER (J.-J.) et QUERCY (J.). — La résistance bactérienne croisée aux antibiotiques. XXX^e Congrès Français de Médecine, Alger, 1955, Masson éd., Paris.
69. MOURIQUAND, SEDAILLAN, DECHAUME et MORIN. — La poliomyélite chez l'homme et le singe. *Rev. Neurol.*, 1930, 1, 1.141.
70. NAUMANN (P.). — Antibiotika-Blutspiegel und Resistenzbestimmung. Chemotherapeutische Korrelationen zwischen Klinik und mikro-biologischem Laboratorium. *Antibiot. Chemother.* (Basel), 1962, 10, 1-93.
71. OLIVIER (H.-R.). — Traité de Biologie appliquée. Tome II : Les diagnostics microbiologiques. Maloine éd., Paris, 1963, 585-591.
72. *Organisation Mondiale de la Santé*. — Standardisation de la méthodologie des tests de sensibilité bactérienne. *O.M.S., Sér. Rapp. Tech.*, 1961, n° 210.

73. *Organisation Mondiale de la Santé*. — Questions de santé publique posées par l'introduction d'antibiotiques dans les aliments de l'Homme et des animaux domestiques. *O.M.S., Sér. Rapp. Tech.*, 1963, n° 260.
74. PELLERAT (J.). — Sur l'élimination salivaire de quelques antibiotiques. *Presse Méd.*, 1963, 71, n° 45.
75. PENAN (H.), VELU (H.), DESTOUCHES (P.), KARATCHENZEFF (N.). — La Pénicilline. Sa valeur, sa mesure. *Rev. Imm.*, 1950, 14, 301.
76. PEQUIGNOT. — Les fièvres résistant aux antibiotiques. *Rev. Médicale du Moyen-Orient*, 1955, 12, 514.
77. PENSO (G.) et NEGRI (R.). — Standardisation de l'antibiogramme. *Progr. Immunobiol. Standard*, 1, 10-17.
78. PREVOT (A.-R.). — Méthode de titrage rapide de la Pénicilline par inhibition du pouvoir réducteur de *Welchia perfringens* sur le vert Janus. *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, 72, 471.
79. PREVOT (A.-R.). — Les bactéries anaérobies. *Traité de Biologie appliquée*, Maloine éd., Paris, 1963, chap. III, 224-226.
80. PREVOT (A.-R.). — Techniques pour le diagnostic des bactéries anaérobies. Editions de la Tourelle, Saint-Mandé, 1963.
81. RAJAM (P.-C.) et ADCOCK (J.-D.). — A rapid test for screening the sensitivity of staphylococci to antibiotics. *Am. J. Clin. Path.*, 1953, 23, 1.168-1.172.
- 81 ^{bis} RANZ (L.-A.) et RANZ (H.-H.). — Sensibilité de différentes bactéries importantes en clinique à quatre antibiotiques. Résultats obtenus avec une méthode de détermination rapide en milieu solide. *Stanford Med. Bull. U.S.A.*, 1953, 2, 183-187.
82. REILLY et LAPLANE. — Rôle du système neuro-végétatif au cours des infections. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 1945, 13.510, D, E, F.

83. RENDI (R.) et OCHOA (S.). — Effect of chloramphenicol on protein synthesis in cell-free preparations of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 3.711.
84. RIVIÈRE (M.). — Septicémie post-partum. Son traitement antibiotique dirigé par l'antibiogramme. *Bull. de la Fédération des Soc. Gyn. et d'Obstét. de Langue française*, 1956, 8, 495.
85. SASSINOT (L.) et CHABBERT (Y.). — Concentrations tissulaires de tétracyclines. *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, 267.
- 85 ^{bis}. SAURAT (P.) et LAUTIÉ (R.). — Bases et principes de l'antibiothérapie.
86. SCUERR (G.-H.). — A new type of impregnated paper disc for determining microbia sensitivity to antibiotics and other chemotherapeutic agents. *Antibiotics and Chemother.*, 1954, 4, 1.007-1.010.
- 86 ^{bis}. SCHWARZ (L.-H.) et BROWN (B.-A.). — Méthode de dilution en milieu liquide améliorée et rapide pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques. *Antib. and Chemoth. U.S.A.*, 1954, 4, 333-337.
87. SMITH (J.-L.) et WEINBERG (E.-D.). — Mechanisms of antibacterial action of bacitracin. *J. Gen. Microbiol.*, 1962, 28, 559-569.
88. TOURNUT (J.) et MONNIER (J.). — Etude de la perméabilité du placenta de la vache à trois antibiotiques (Pénicilline, Oxytétracycline, Chloramphénicol). *Rev. Méd. Vét.*, 1962, 25, 663-671.
89. TROUYEZ (G.). — Méthode rapide de détermination de l'antibiogramme. Comparaison avec les techniques classiques. *Progr. Immunobiol. Standard.*, 1, 39-42.
90. TURPIN (R.) et VELU (H.). — Thérapeutique antibiotique. Doin éd., Paris, 1957.

91. VELU (H.). — La Pénicilline et son appréciation. Considérations générales sur son importance thérapeutique. *Bull. Acad. Vét. France*, 1949, 22, 265.
92. VELU (H.), PENAN (H.), SUREAU (B.), CHABBERT (Y.), DESTOUCHES (P.) et KARAT CHENTZEFF (N.). — Dosage de la Pénicilline dans le sang ; ses difficultés, son importance clinique. *Ann. Pharm. Franç.*, 1950, 8, 26.
93. VINCENT (V.-G.) et VINCENT (H.-W.). — Filter paper disc modifications of the Oxford cup Penicillin determinations. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1944, 55, 162.
94. WAISBREN (B.-A.), SIMSKI (C.) et CHANG (P.-L.). — Administration of maximum dosis of chloramphenicol. *Amer. J. Med. Sci.*, 1963, 245, 1-11.
95. WARD (J.-R.) et MARTIN (C.-H.). — Production of L phase variants of bacteria with cycloserine. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)*, 1962, 111, 156-160.
96. WEINBERG (E.-D.). — Selective inhibition of microbial growth by the incorporation of triphenyl tetrazolium chloride in culture media. *J. Bact.*, 1953, 66, 240-242.
97. WELSCH (M.). — La résistance bactérienne aux antibiotiques. XXX^e Congrès Français de Médecine, Alger, 1965. Masson éd., Paris.
98. WELSCH (M.). — Savoir interpréter les analyses bactériologiques et les épreuves de sensibilité aux antibiotiques. De Visscher éd., Bruxelles, 1956, 73-85.
99. WELSCH (M.). — Un vieux problème toujours d'actualité : la résistance des germes aux agents chimiothérapiques. *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.*, 1962, 7, 870-876.
100. WERNER (C.), ADAMS (C.) et DU BOIS. — Absorption et excrétion de la Viocine chez l'Homme. *Proc. Soc. for Exper. Biol. Med.*, 1951, 76, 292.

101. WUNDT (W.). — Untersuchungen über die Reduktionswirkung von Bakterien auf Triphenyltetrazolium chloride. *Dtsche Med. Wschr.*, 1950, 75, 1.471-1.472.
 102. YAGI (K.) et OZAWA (T.). — Mechanism of inhibition of D-amino acid oxidase. III. Kinetic analysis of the behaviour of chloramphenicol, streptomycin and penicillin in their competition with flavin-adenine dinucleotide. *Bioch. Biophys. Acta*, 1960, 39, 304-310.
-

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	13
INTRODUCTION	15

PREMIERE PARTIE

<i>Etude générale et théorique de l'antibiogramme</i>	19
GÉNÉRALITÉS. — Définition - Historique - Commentaires	19
CHAPITRE I. — <i>Bases théoriques</i>	23
Les antibiotiques et leur mode d'action	23
Antibio-sensibilité	30
Antibio-résistance	33
CHAPITRE II. — <i>Techniques générales</i>	43
CHAPITRE III. — <i>Eléments d'appréciation de la valeur d'un test de sensibilité</i>	55

DEUXIEME PARTIE

<i>Applications : L'antibiogramme en bactériologie vétérinaire</i>	67
CHAPITRE I. — <i>Les prélèvements</i>	67

CHAPITRE II. — <i>Techniques utilisées en Bactériologie vétérinaire</i>	71
Section I : Bactéries aérobies	71
Section II : Bactéries anaérobies	81
CHAPITRE III. — <i>Interprétation et utilisation de l'antibiogramme par le Clinicien</i>	87

TROISIEME PARTIE

<i>Recherches personnelles : Etude d'une méthode rapide de détermination de l'antibiogramme</i>	97
CHAPITRE I. — <i>Le « Dade Stat Tray »</i>	97
CHAPITRE II. — <i>Valeur du « Dade Stat Tray »</i>	103
CONCLUSION	119
BIBLIOGRAPHIE	121

IMPRIMERIE DELZANNO s.a.

32, Cours d'Herbouville, 32

LYON

1965

